



Universidad
Zaragoza

Terapia génica de las enfermedades mitocondriales mediante xenoexpresión de la oxidasa alternativa AOX

Trabajo fin de Máster

Amaya López Pascual

06/09/2013

Directores:

Patricio Fernández Silva

Patricia Meade Huerta



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Universidad de Zaragoza
Máster en Biología Molecular y Celular 2012-2013

Índice

| | |
|--|----|
| Introducción..... | 3 |
| Características de la mitocondria | |
| Origen de la mitocondria | |
| DNA mitocondrial en mamíferos | |
| Proteínas mitocondriales | |
| Rutas metabólicas en la mitocondria | |
| El sistema de fosforilación oxidativa | |
| Vías alternativas de transporte de electrones | |
| Modelos de organización de la cadena de transporte de electrones | |
| Patología mitocondrial | |
| Terapia de las enfermedades mitocondriales | |
| Hipótesis y objetivos..... | 20 |
| Materiales y métodos..... | 21 |
| Muestras biológicas | |
| Ácidos nucleicos para genotipado | |
| Purificación de mitocondrias de tejidos de ratón | |
| Seguimiento de longevidad | |
| Ensayos de respuesta al estrés térmico | |
| Ensayos de respuesta a dieta hiperlipídica | |
| Medidas de actividad motora | |
| Actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) por espectrofotometría | |
| Expresión de proteína AOX | |
| Análisis histológicos | |
| Análisis de datos | |
| Resultados..... | 39 |
| Seguimiento de longevidad | |
| Ensayos de respuesta al estrés térmico | |
| Ensayos de respuesta a dieta hiperlipídica | |
| Medidas de actividad motora | |
| Actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) por espectrofotometría | |
| Expresión de proteína AOX | |
| Análisis histológicos | |

| | |
|---|----|
| Discusión..... | 45 |
| Interpretación de los resultados | |
| Falta de correlación y limitaciones | |
| Relación con estudios previos | |
| Consecuencias, aplicaciones y sugerencias para estudios posteriores | |
| Conclusión..... | 50 |
| Bibliografía..... | 51 |

1. Introducción

1.1. Características de la mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos que forman parte de los organismos eucariotas y se encuentran en el citosol en proporciones variables según el tipo de tejido. Su tamaño varía entre 0,5 y 10 μm de diámetro y hasta 7 μm de longitud. Las variaciones en número se deben a las funciones que desempeñan en los diferentes tejidos en los que se encuentran. Estructuralmente son orgánulos con dos membranas que separan tres compartimentos: citoplasma, espacio intermembrana y matriz mitocondrial (Figura 1). Las funciones que se llevan a cabo en cada una de las membranas son posibles gracias a estos compartimentos. La membrana externa es una bicapa lipídica permeable que permite el paso de iones, metabolitos y otras moléculas pequeñas de hasta 10 kDa y diámetro de unos 2 nanómetros, tiene poca actividad enzimática y contiene alrededor de un 50% en peso de proteínas. A diferencia de ésta, la membrana interna está formada por una barrera muy selectiva, contiene un 70-80% de proteínas y carece de poros por lo que el gradiente de protones se mantiene, permitiendo la producción energética. Esta membrana tiene pliegues denominados crestas mitocondriales, que aumentan notablemente su superficie permitiendo albergar complejos enzimáticos y sistemas de transporte transmembrana, implicados en la translocación de moléculas. Entre las proteínas que componen la membrana interna se encuentran las que forman la cadena de transporte de electrones, imprescindible para el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). El espacio intermembrana tiene una alta concentración de protones como resultado de la función de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. Además se encuentran enzimas que intervienen en la transferencia del enlace de alta energía del ATP, como la creatina quinasa o la adenilato quinasa, así como moléculas de transporte. En la matriz mitocondrial se encuentran los metabolitos que se utilizarán en la obtención de energía, así como el DNA mitocondrial (mtDNA) y moléculas necesarias para la replicación, transcripción y traducción del material genético. La presencia de un genoma propio es una característica de las mitocondrias que determina una biogénesis especial con respecto al resto de la célula. El DNA del orgánulo es circular de doble cadena, se replica y transcribe en la matriz mitocondrial, y suelen existir varias moléculas por orgánulo. El número de copias del mtDNA es variable en función del tipo y de las necesidades energéticas de la célula, siendo en mamíferos del orden de 10^3 - 10^4

moléculas por célula. En la matriz mitocondrial se producen las reacciones de diferentes rutas metabólicas, entre ellas la beta-oxidación de ácidos grasos y el ciclo de Krebs.

Debido a estas características las mitocondrias pueden llevar a cabo una serie de funciones indispensables que desencadenan en la obtención de la mayor parte de la energía necesaria para la célula por medio de la fosforilación oxidativa [1].

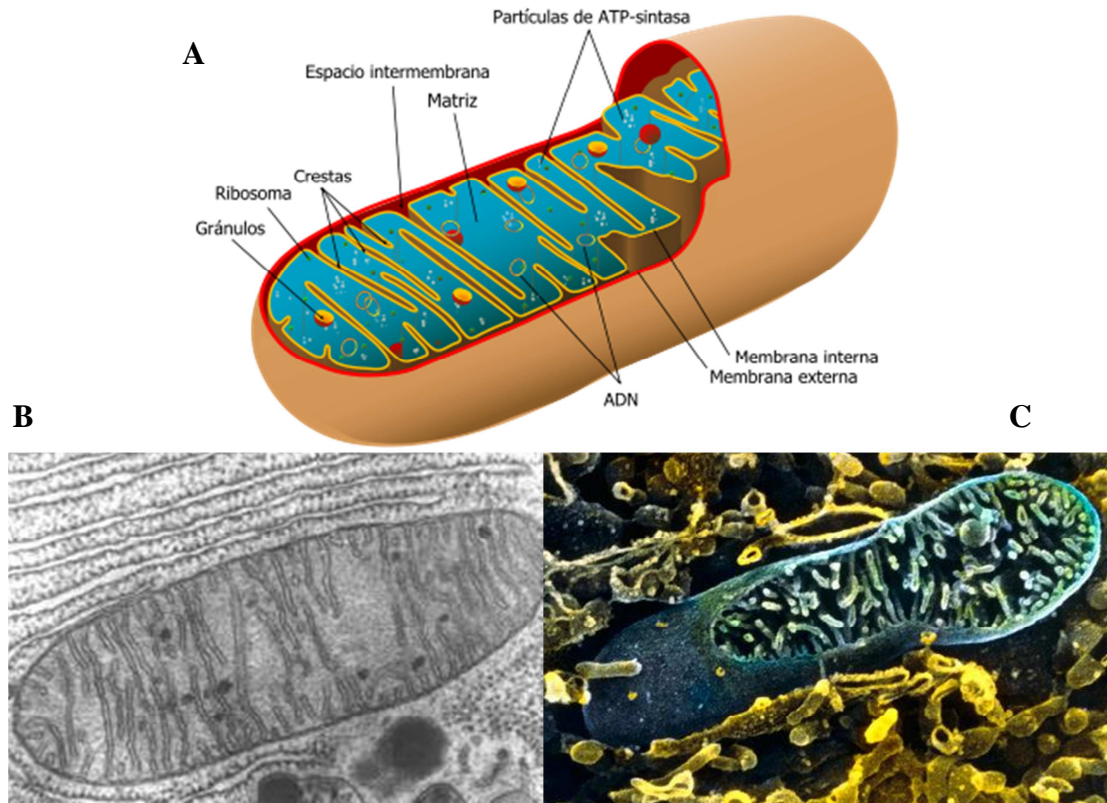


Figura 1. Mitocondrias: A: estructura, B: micrografía electrónica de transmisión (MET) y C: micrografía electrónica de barrido (SEM).

1.2. Origen de la mitocondria

Un grupo de científicos estadounidenses, con Lynn Margulis a la cabeza, recuperó en 1967 una antigua hipótesis, reformulándola como Teoría de la Endosimbiosis Seriada [2]. Según la teoría, las mitocondrias son orgánulos derivados de la endosimbiosis de un organismo del grupo de las α -proteobacterias con un ancestro de una célula eucariota que contenía un núcleo. Se estima que este hecho, que sucedió hace unos 1500 millones de años, se produjo debido a la fusión de una célula procariota heterótrofa que empleaba el oxígeno molecular como oxidante, con una eucariota primitiva al ser fagocitada sin ser digerida de forma inmediata. Así se estableció una simbiosis permanente entre las células intercambiando producción de energía en forma de ATP (proporcionada por el simbionte procariota) por un medio rico en nutrientes (de la célula hospedadora). La

simbiosis se podría dar por acabada en el momento en el que la célula simbiote llega a formar parte del organismo hospedador convirtiéndose en la mitocondria. Esta teoría explica en parte la similitud de estructura y fisiología entre α -proteobacterias y mitocondrias.

Con la evolución de las células eucariotas la mayoría de los genes mitocondriales han sido transferidos al núcleo, por lo que la mitocondria no sería viable fuera de la célula hospedadora y ésta no suele serlo sin mitocondrias.

1.3. DNA mitocondrial en mamíferos

Las mitocondrias tienen su propio sistema genético que codifica un pequeño número de proteínas que forman parte del sistema de fosforilación oxidativa, mientras que la mayoría están codificadas en el núcleo. La biogénesis de la mitocondria requiere de la expresión coordinada de los dos sistemas genéticos celulares, nuclear y mitocondrial. Los mecanismos básicos de replicación y transcripción del mtDNA, además de los elementos y proteínas implicadas, están bastante bien caracterizados. El mtDNA fue descubierto en 1963 [3] pero no se describió su secuencia completa en humanos y ratón hasta 1981 [4, 5]. Su secuencia se ha ido revisando y completando para diferentes especies con el paso de los años [6, 7]. Por tanto, la biogénesis de las mitocondrias es un caso único en la célula animal ya que se encuentra controlado por dos sistemas genéticos celulares que deben actuar de forma coordinada.

El genoma mitocondrial de mamíferos (Figura 2) es una molécula circular cerrada de doble cadena alrededor de 16 Kb con una organización genética muy compacta. Este genoma carece de intrones y los genes se suceden sin la existencia de material genético no codificante a excepción de una pequeña región denominada bucle de desplazamiento (D-loop) de unas 1000 pb que contiene la mayoría de los elementos de control de la replicación y la transcripción. El mtDNA humano, tomado como modelo de todos los mamíferos, consta de 16569 pb, cuya secuencia se conoce en su totalidad [4], codifica 37 genes: 2 RNA ribosómicos (rRNAs), 22 RNA de transferencia (tRNAs) y 13 polipéptidos integrantes de los complejos multienzimáticos del sistema OXPHOS, siete de los 46 polipéptidos del complejo I o NADH ubiquinona oxidoreductasa (ND: 1, 2, 3, 4L, 4, 5 y 6), uno de los 11 polipéptidos del complejo III o ubiquinol citocromo c oxidoreductasa (cytb), tres de los 13 del complejo IV o citocromo c oxidasa (COXI, COXII y COXIII) y dos subunidades de las 16 de la ATP sintasa o complejo V (ATP6 y ATP8). Los genes de los tRNAs se localizan separando los rRNAs y los mRNAs. El

El mtDNA difiere del nDNA debido a una serie de características entre las que destaca la presencia de un código genético mitocondrial relativamente diferente del código genético universal [13]. Además, tiene una alta tasa de mutación (más de 10 veces superior al nDNA) que se atribuye a su exposición a las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en el interior de la mitocondria, la presencia de muchas copias por célula (poliploidía) y a la ausencia de sistemas eficientes para su reparación [14]. Además, tiene un modo de organización y expresión muy específico (sin intrones), y un modo de transmisión muy especial. Así, el genoma mitocondrial se hereda por vía materna, puesto que las mitocondrias de los espermatozoides se degradan selectivamente y permanecen únicamente las mitocondrias que se derivan del óvulo. Este modo de herencia impide la recombinación de los genomas mitocondriales paternos. Este hecho podría haber contribuido, junto con la alta tasa de producción de ROS en el interior de la mitocondria, a la migración de genes mitocondriales al núcleo, donde pueden sufrir recombinación y eliminar más fácilmente variantes deletéreas [9, 15]. En los animales, los únicos genes que han permanecido en la mitocondria están asociados a la función de síntesis de energía en forma de ATP a través del sistema OXPHOS.

Otra característica interesante es la posibilidad de coexistencia de varias formas alélicas de mtDNA en un mismo individuo, pudiendo diferir su proporción relativa según el tejido (heteroplasmia). La coexistencia de varias moléculas de mtDNA por mitocondria y de numerosas mitocondrias por célula origina una situación particular, diferente de la del núcleo para la dosis de variantes alélicas (Figura 3). Así, una mutación en un mtDNA creará una población mezclada de moléculas de tipo salvaje y mutante. El porcentaje de heteroplasmia puede variar y, en principio, el reparto de mitocondrias a las células hijas en la división celular es al azar, lo que puede provocar variaciones en los porcentajes de mutación a lo largo de los linajes celulares (segregación replicativa). La heteroplasmia en los diferentes tejidos de un mismo individuo suele hacer necesaria la necesidad de alcanzar un umbral de DNA mutante para que empiecen a manifestarse los efectos patológicos de la mutación [9-16].

El mtDNA es altamente polimórfico, presentando diferencias genéticas entre individuos de la misma especie, sobre todo entre diferentes grupos étnicos en el caso de humanos. Los haplotipos de mtDNA se basan en patrones específicos de polimorfismos que se están investigando en relación con procesos como la motilidad espermática [17], el

envejecimiento [18], la susceptibilidad a diversas enfermedades [12] o la expresión de algunas mutaciones del mtDNA [19].

En general, cada mitocondria contiene varias moléculas de mtDNA en asociación con proteínas formando unos complejos conocidos como nucleoides que contienen entre 2 y 10 moléculas de mtDNA. El factor de transcripción mitocondrial A (mTFA o TFAM), la proteína de unión al DNA de hebra sencilla (mtSSB), la helicasa Twinkle y la DNA polimerasa gamma (POLG), entre otras proteínas, son parte de estos nucleoides [9]. Se ha descrito que la organización del mtDNA en los nucleoides es importante durante la segregación y afecta al grado de heteroplasmia [20].

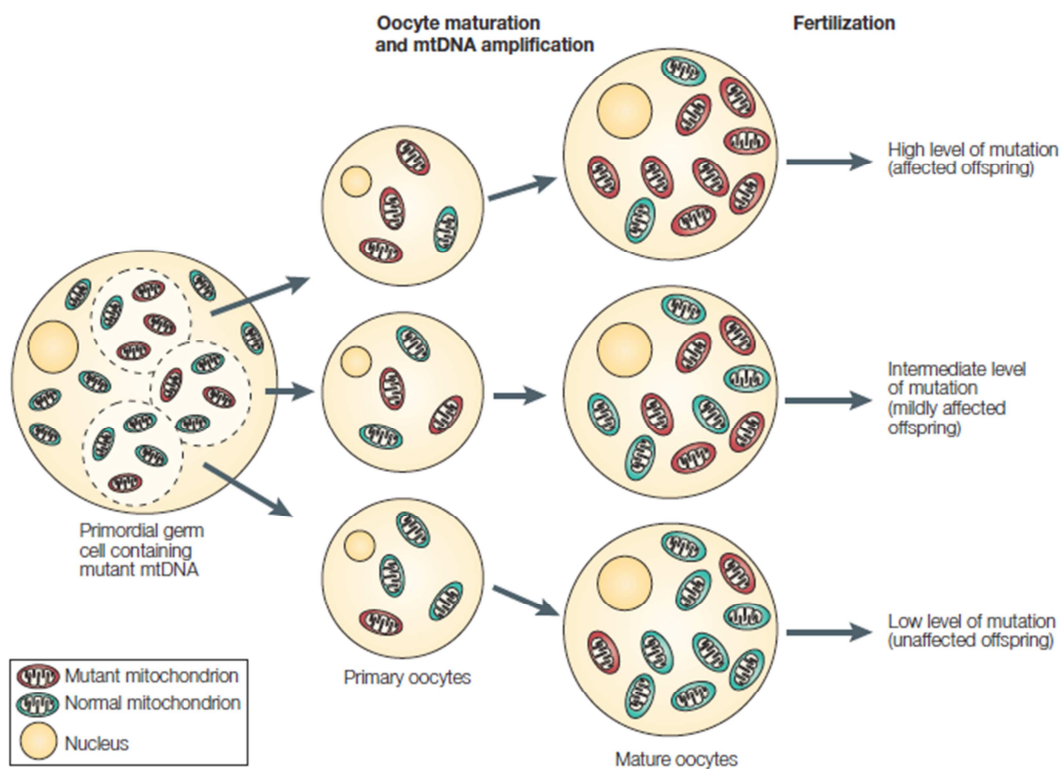


Figura 3. Selección genética mitocondrial. En la producción de oocitos primarios una serie de moléculas de mtDNA se transfieren a cada oocito. Durante la maduración se produce una replicación rápida, que al amplificar las moléculas puede derivar en cambios aleatorios entre generaciones con niveles variables de mtDNA mutante. Las mitocondrias con mtDNA mutado están en rojo mientras que las de genotipo salvaje están en verde.

1.4. Proteínas mitocondriales

Las mitocondrias contienen cientos de proteínas diferentes (en mamíferos se estima que alrededor de 1500), de las que sólo alrededor de un 1% están codificadas por el mtDNA [4, 10]. El resto están codificadas por genes nucleares y sintetizadas por ribosomas citosólicos. Debido a la estructura de membranas de la mitocondria el importe de proteínas es más complejo que la transferencia de moléculas a través de las bicapas

fosfolipídicas sencillas. Las proteínas atraviesan la membrana externa a través del sistema de translocadores mitocondriales externo e interno (TOM y TIM) que reconocen señales de importe de proteínas específicas para cada espacio del orgánulo. En el caso de ser proteínas del espacio intermembrana solo tendrán señales de importe a través de TOM, mientras que si tienen señales de importe a la matriz atravesarán TOM y TIM [1].

Las proteínas codificadas por el mtDNA interaccionan con proteínas codificadas en el nDNA que son importadas de forma selectiva a la mitocondria [21, 22]. Así se forman los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial I, III y IV, siendo el complejo II codificado exclusivamente por el núcleo. La cadena de transporte de electrones junto con la ATP sintasa (Complejo V) se encargan de realizar una de las funciones mitocondriales más importantes, el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) [16], a través del cual la célula obtiene el 90% de su energía en forma de ATP. Existen otros procesos metabólicos que tienen lugar en la mitocondria como son el ciclo de Krebs, la beta-oxidación de los ácidos grasos, el ciclo de la urea o la síntesis de pirimidinas [15]. Algunas de estas rutas metabólicas también dependen directamente de un buen funcionamiento del sistema OXPHOS. Por ejemplo, la beta-oxidación o la síntesis de pirimidinas se verán bloqueadas si no funcionan los complejos respiratorios III y IV.

1.5. Rutas metabólicas en la mitocondria

Las células utilizan la oxidación de la glucosa, ácidos grasos y otros sustratos para la producción de ATP. En el caso de la glucosa se dan un conjunto de reacciones conocidas como glucólisis que se producen en el citoplasma celular independientemente de la mitocondria, pero solo se obtienen 2 moléculas de ATP frente a las 32-34 que se obtienen mediante la oxidación completa de la glucosa a CO_2 y H_2O en la fosforilación oxidativa, en la mitocondria. Los metabolitos que se obtienen en las etapas finales de obtención de energía en el citoplasma son importados a la matriz mitocondrial donde se oxidan a acetil-coenzima A. La oxidación de este grupo en el ciclo de Krebs genera $\text{NADH}+\text{H}^+$ y FADH_2 , que serán utilizados por la cadena de transporte de electrones como equivalentes de reducción. Los electrones de dichas moléculas son movilizados a través de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial hasta llegar al complejo IV, donde son cedidos al oxígeno, para formar agua, generando un gradiente de protones que es utilizado por el complejo V para la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i .

Finalmente, el ATP generado es liberado al citosol, intercambiado por ADP a través de la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT).

Además de la bioenergética, las mitocondrias cumplen otras funciones en el metabolismo de aminoácidos y lípidos [23], en la biosíntesis de pirimidinas, del grupo hemo y de los clusters Fe-S [24], así como en la apoptosis y señalización celular [25].

1.6. El sistema de fosforilación oxidativa

La cadena de transporte de electrones (complejos I-IV) junto con la síntesis de ATP (complejo V) forman el sistema OXPHOS. Los electrones que proceden del $\text{NADH} + \text{H}^+$ pasan sucesivamente a través del complejo I, la ubiquinona, el complejo III y el citocromo c para llegar finalmente al complejo IV, el cual los cede al oxígeno molecular para formar H_2O . También desde el FADH_2 los electrones, que vienen del complejo II, o de otras enzimas como la glicerol 3-P deshidrogenasa o la flavoproteína transferidora de electrones (ETF) asociada a la beta-oxidación, pasan a la ubiquinona y después de la misma forma que por la otra vía hasta el oxígeno molecular (Figura 4).

Los complejos I, III y IV son los puntos de la cadena en los que se produce un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana. Este bombeo de protones genera un potencial de membrana o gradiente electroquímico (de pH o electrogénico) que es aprovechado por el complejo V para la síntesis de ATP, completando el proceso de fosforilación oxidativa. Este ATP se utiliza en los tejidos para abastecer las necesidades energéticas celulares.

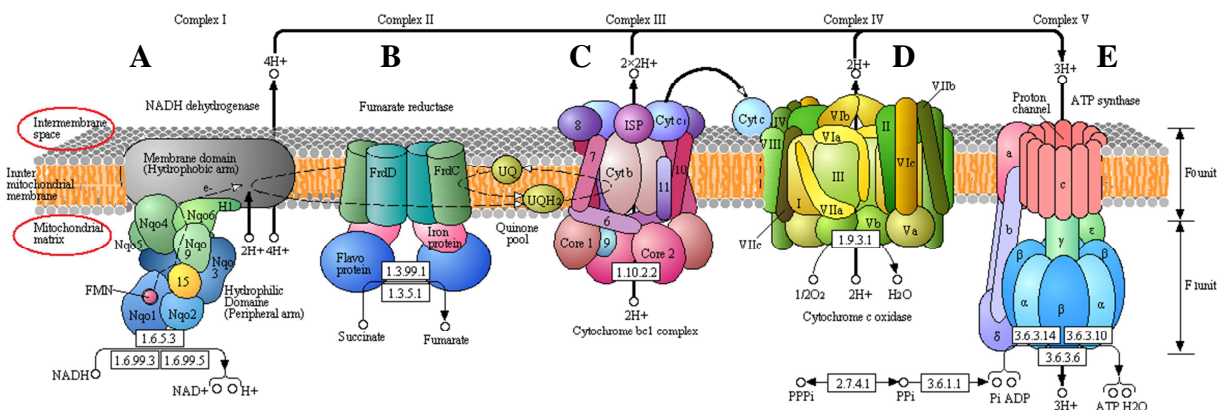


Figura 4. Esquema OXPHOS. En la figura se muestran los cinco complejos así como el paso de electrones y el bombeo de protones. A-E explicados de forma individual en las siguientes figuras.

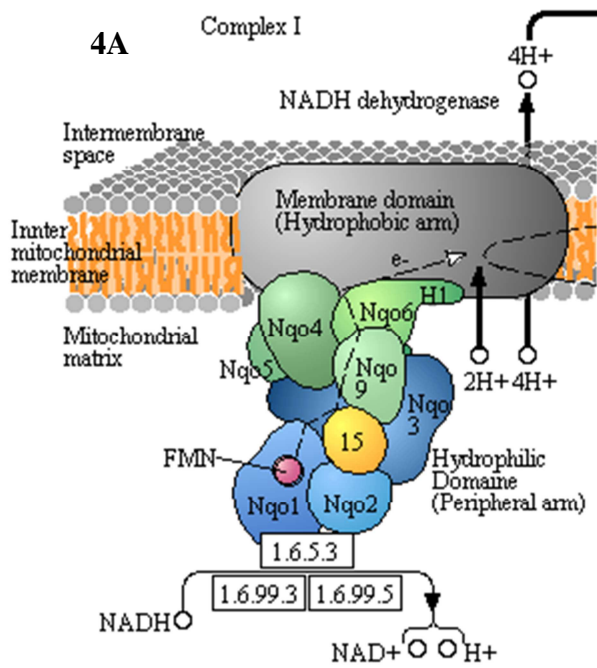


Figura 4B. Complejo II, fumarato reductasa o succinato deshidrogenasa. Este complejo está compuesto por cuatro subunidades codificadas por el genoma nuclear. Contiene tres centros Fe-S, un grupo citocromo b558 y una molécula FAD unida por enlace covalente como grupos prostéticos.

Este complejo tiene una función doble, en el ciclo de Krebs transforma el succinato en fumarato y en la cadena de transporte electrónico transfiere electrones desde el FADH_2 hasta la ubiquinona. No tiene actividad de bombeo de protones al espacio intermembrana.

Figura de la estructura del complejo II de *E. coli*.

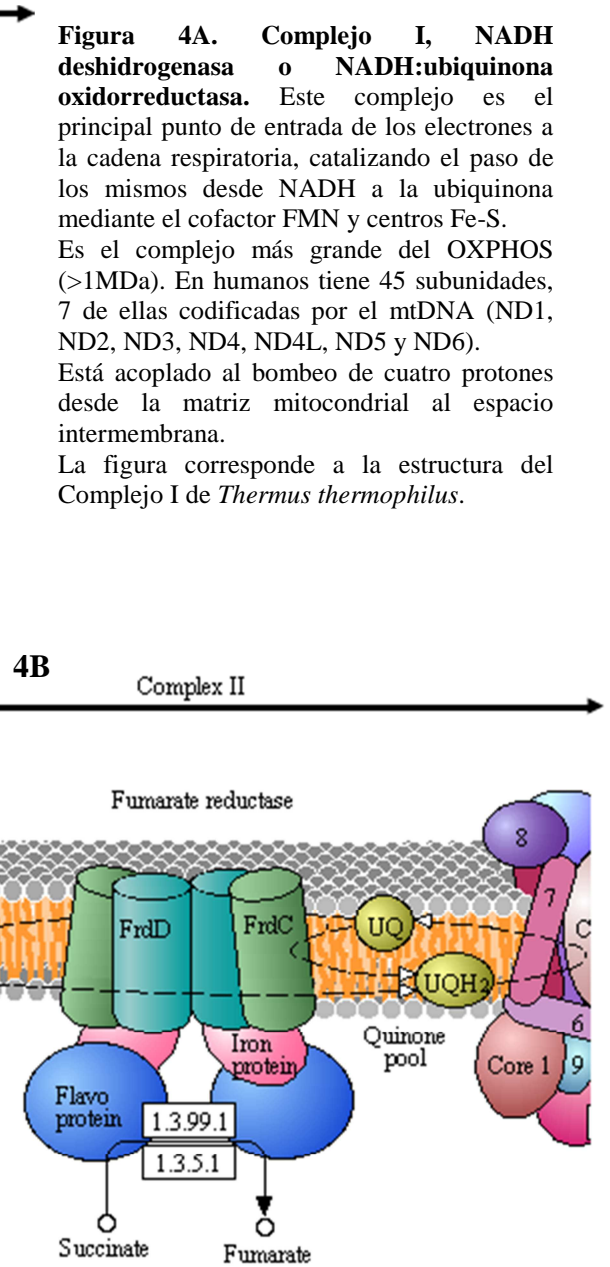


Figura 4C. Complejo III, ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa o complejo bc₁ mitocondrial. Este complejo es dimérico y cada monómero está compuesto por 11 subunidades estructurales (de las cuales solo la subunidad III o CYT b esta codificada en el mtDNA, contiene los citocromos b), que se encuentran en la membrana interna mitocondrial, y varios grupos redox, entre ellos los citocromos b₅₆₆, b₅₆₂ y c₁ y un centro binuclear Fe-S, conocido como centro Rieske. La función de este complejo es catalizar el paso de dos electrones desde el ubiquinol (ubiquinona reducida) hasta el citocromo c.

Lleva acoplado el bombeo de cuatro protones al espacio intermembrana por el ciclo Q, en el que el citocromo b tiene un papel fundamental.

En la figura se muestra el complejo III bovino.

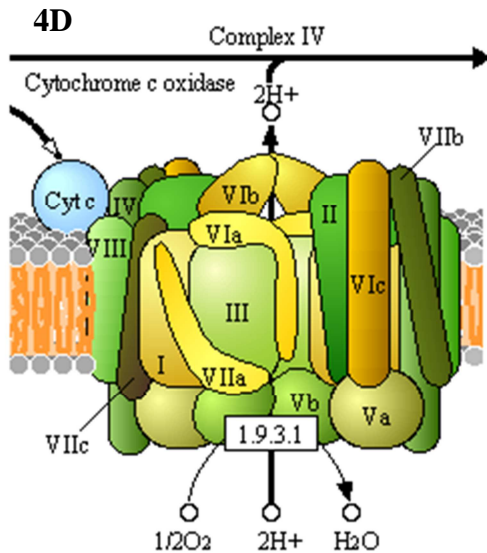


Figura 4D. Complejo IV, citocromo c reductasa. Es el último de los complejos de la cadena de transporte de electrones, solo es funcional como dímero y su función es la de catalizar la oxidación del citocromo con la consiguiente reducción del O_2 a H_2O .

En mamíferos tiene un peso molecular de 200 kDa y se localiza en la membrana interna mitocondrial. Está formado por 13 proteínas (de las cuales tres están codificadas en el mtDNA: COX1, COX2 y COX3) y como grupos prostéticos contiene dos citocromos, hemo-a y hemo-a₃, así como dos centros de cobre Cu_A y Cu_B . Las tres proteínas codificadas por el mtDNA forman el núcleo catalítico y contienen los grupos prostéticos (COX1 y COX2).

El proceso lleva acoplado el bombeo de dos protones desde la matriz al espacio intermembrana por cada molécula de H_2O formada.

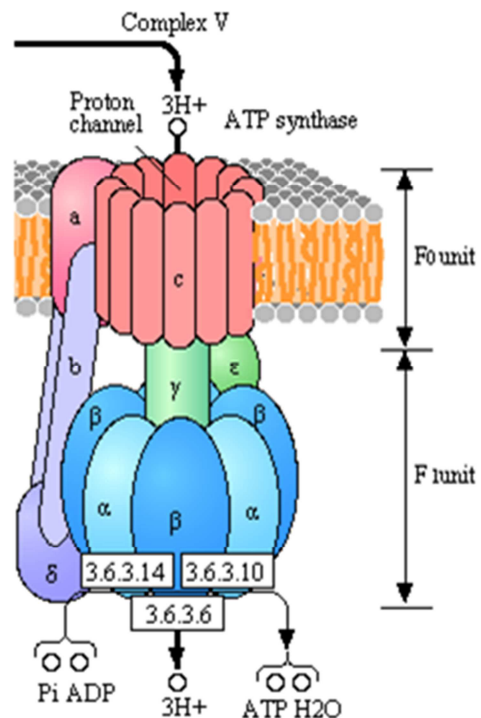
Figura de la estructura del complejo IV bovino.

Figura 4E. Complejo V, ATP sintasa o F_1F_0 -ATPasa.

Es el último complejo enzimático del OXPHOS cuya función es la de catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i . Para ello utiliza la energía del gradiente electroquímico de protones creado en el proceso de respiración mitocondrial por los anteriores complejos.

Está formado por 16 proteínas que forman dos dominios funcionales F_1 y F_0 , conectados entre sí por un tallo. F_1 está localizado en la matriz mitocondrial y forma el dominio catalítico de la ATP sintasa. La región F_0 se encuentra anclada en la membrana interna mitocondrial y actúa de poro proteico y permitiendo que la energía liberada por el paso de protones al romperse el gradiente electroquímico se conduzca hacia la subunidad catalítica. Solo dos proteínas que forman parte del dominio F_0 están codificadas por el mtDNA (mt-Atp6 y A6L: ATPasa 6 y ATPasa 8).

En la figura aparece la ATP sintasa de *E. coli*.



1.7. Vías alternativas de transporte de electrones

A diferencia de los mamíferos, las plantas y algunos eucariotas inferiores como protozoos y hongos contienen otras enzimas redox mitocondriales que proporcionan vías alternativas al transporte de electrones. Entre ellas podemos encontrar NADH deshidrogenasas alternativas (NADH-DH), capaces de catalizar la oxidación del NADH de la matriz o del citosol directamente, y las oxidasas alternativas (AOX), que pueden aceptar electrones desde el ubiquinol y cedérselos al oxígeno. Estas enzimas alternativas no bombean protones al espacio intermembrana mitocondrial, pero su organización dentro de la cadena hace posible la transferencia electrónica desde NADH hasta O_2 acoplada a la transferencia de protones, al menos por un complejo [26].

Oxidasa alternativa

El gen AOX está presente en una amplia variedad de organismos, desde hongos, plantas y protistas, hasta metazoos. Así, se ha detectado la presencia de AOX en 28 especies animales de nueve *phyla* diferentes: *Porifera*, *Placozoa*, *Cnidaria*, *Mollusca*, *Annelida*, *Nematoda*, *Echinodermata*, *Hemichordata* y *Chordata* [27]. A pesar de ello está ausente en el genoma de vertebrados y artrópodos. En plantas, AOX es un homodímero, mientras que en hongos y animales parece ser un monómero. Además, en animales el extremo carboxilo de AOX posee una secuencia común y carece de una cisteína importante para la regulación en plantas, lo que ha facilitado su identificación mediante técnicas bioinformáticas.

El cianuro puede inhibir la respiración en mamíferos, bloqueando el transporte de electrones desde el citocromo c hasta el O_2 , actuando a nivel del complejo IV. Muchos microorganismos y plantas sintetizan compuestos cianógenos para su defensa, ante los cuales algunos parásitos son capaces de sobrevivir en sus huéspedes pese a la producción de inhibidores del complejo IV por parte del organismo hospedador [28]. Dicha resistencia al cianuro, se basa en la presencia de AOX anclada a la membrana interna mitocondrial que posee un doble núcleo de Fe que actúa como centro catalítico de la enzima. Su función es la de transportar los electrones desde el ubiquinol hasta el O_2 , permitiendo saltar desde el complejo I hasta el aceptor final de electrones sin pasar por la parte de la cadena dependiente de citocromos (complejos III y IV) (Figura 5).

En plantas, AOX parece ser protector frente al estrés oxidativo ya que reduce la acumulación de ubiquinol, que favorece la formación de radicales libres, siendo esta una de las funciones que se le atribuye en algunas especies [29]. Además, es capaz de orientar la respiración hacia una menor generación de energía porque se evita la translocación de protones en los pasos dependientes de citocromo y así la generación de gradiente electroquímico. Debido a esta incapacidad de AOX de bombear protones, la energía que se produce en la transferencia de electrones se disipa en forma de calor. Esta característica le permite realizar otra de sus principales funciones en plantas, independiente del estrés oxidativo: la regulación de la termogénesis [30].

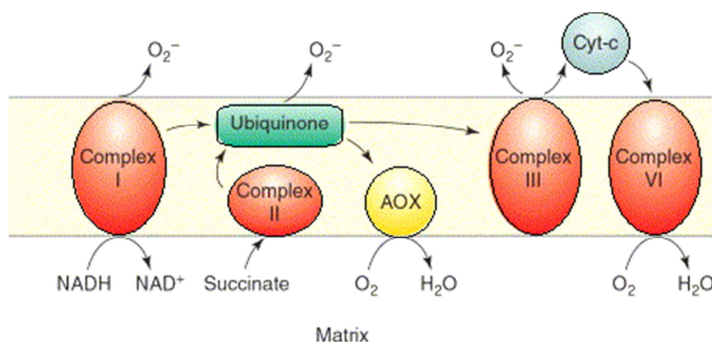


Figura 5. Cadena de transporte de electrones con AOX. Las flechas indican el flujo de electrones a través de los complejos. AOX reduce O_2 con los electrones que recibe del ubiquinol.

1.8. Modelos de organización de la cadena de transporte de electrones

A pesar del conocimiento estructural de los complejos respiratorios individuales, su organización supramolecular es poco conocida. Para la organización del sistema OXPHOS se propuso en primer lugar un modelo fluido, en el que los complejos y transportadores permanecían libres y difundían en la membrana interna, de forma que la transferencia de electrones se produce gracias a las colisiones que se dan de forma aleatoria [31].

Estudios posteriores aportaron datos que apoyaban una mayor organización de los complejos respiratorios [32]. Esta organización se basaría en uniones de los complejos a la membrana con unas condiciones y estequiometrías determinadas, formando unas unidades funcionales llamadas supercomplejos o respirosomas según un modelo denominado “sólido”. El modelo dominante y generalmente aceptado hasta hace pocos años ha sido el modelo fluido. Estos dos modelos, sólido y fluido, proporcionan una explicación parcial del sistema OXPHOS, por lo que se ha sugerido la integración de las observaciones experimentales para la coexistencia de ambas formas de organización en una forma dinámica. Recientemente, la existencia de supercomplejos (SC), así como su capacidad respiratoria, han sido investigadas en el grupo GENOXPHOS y los resultados demostraron que la formación de SC es dependiente de la presencia de los complejos constituyentes y su ensamblaje es posterior al de los complejos individuales que lo componen. También se demostró que la ubiquinona y el citocromo c estaban presentes en los SC y que éstos mantenían su capacidad de transferir los electrones desde el NADH hasta el oxígeno [33]. Con estos resultados, el grupo ha propuesto un nuevo modelo de organización llamado “de plasticidad” que integra a los dos anteriores. En este modelo se propone que los complejos I, III y IV se encuentran en parte asociados en SC que contienen diferentes cantidades estequiométricas de cada complejo individual y también en parte como complejos libres. Esta organización implicaría un transporte de electrones más eficiente y con capacidad de adaptarse a diferentes situaciones y necesidades [33,34]. El grupo ha proporcionado, muy recientemente [34], evidencias que refuerzan el modelo de plasticidad al describir el primer factor de ensamblaje de supercomplejos y demostrar la modulación de los niveles de determinados SC en respuesta a un cambio en la fuente de energía utilizada por la célula.

1.9. Patología mitocondrial

Las enfermedades mitocondriales, y más específicamente las enfermedades debidas a defectos del sistema OXPHOS, constituyen en conjunto uno de los desórdenes metabólicos innatos más frecuentes, aunque se consideran enfermedades raras por su baja prevalencia en la población. Debido al doble control genético, los defectos en el sistema OXPHOS pueden ser debidos a mutaciones en el mtDNA o en nDNA, y manifiestan una gran variedad de fenotipos clínicos, que aparecen en la infancia o en la edad adulta. Estos defectos pueden afectar a diferentes tejidos y órganos, de una manera específica de tejido o multisistémica. Sin embargo, los tejidos con alta demanda energética como cerebro, corazón y músculo esquelético son más vulnerables de sufrir efectos perjudiciales, mientras que riñón, hígado, ojo, médula ósea, páncreas y sistema nervioso periférico pueden verse afectados aunque sucede en menos ocasiones. Las enfermedades mitocondriales son patologías que tienen en común un defecto de síntesis de ATP y pueden clasificarse en cuatro categorías dependiendo del tipo de mutación que las provoca: grandes reorganizaciones del mtDNA, mutaciones puntuales en tRNAs y rRNAs, mutaciones de genes que codifican proteínas mitocondriales y mutaciones en genes nucleares.

En el caso de mutaciones del mtDNA, esta heterogeneidad de los desórdenes mitocondriales es consecuencia de la herencia materna, la heteroplasmia, la segregación replicativa y el efecto umbral. Desde hace varias décadas se están estudiando las características estructurales e histoquímicas de tejidos afectados por patologías mitocondriales y su relación con la alteración del mtDNA [35]. Las mutaciones descritas en el mtDNA están recogidas en MITOMAP (<http://www.mitomap.org>).

Grandes reorganizaciones del mtDNA

En este grupo se engloban normalmente las deleciones o duplicaciones espontáneas en el mtDNA, presentándose en heteroplasmia con una proporción de mtDNA mutado variable en función del tejido. Estas mutaciones están asociadas a diferentes patologías con un fenotipo característico: el Síndrome de oftalmoplejia externa progresiva crónica (CPEO), el Síndrome de Kearns-Sayre (miopatía, oftalmoplejia, cardiomiopatía) y el Síndrome de Pearson (anemia macrocítica, trombocitopenia, neutropenia, acidosis láctica). Todas estas patologías tienen en común grandes deleciones de entre 1 y 9 Kb que se localizan en el arco comprendido entre los dos orígenes de replicación pero sin incluirlos, aunque implican la eliminación completa de algún tRNA. Las deleciones no

suelen heredarse pero las duplicaciones pueden transmitirse genéticamente vía materna. Las duplicaciones forman dímeros de mtDNA normal y delecionado, que son menos frecuentes pero heredables [9, 12].

Mutaciones puntuales en tRNAs o rRNAs

Aproximadamente la mitad de las mutaciones descritas en el mtDNA se localizan en los genes codificantes de tRNAs. Se ha observado que mutaciones en los genes de tRNAs producen gran variedad de defectos que se asocian con síndromes como el MERRF (síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas) o el MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidente cerebrovascular), mientras que las mutaciones en los genes de rRNAs se han asociado principalmente a fenotipos de sordera, sobre todo tras el tratamiento con aminoglicósidos. También se han descrito mutaciones responsables de la intolerancia al ejercicio y de la aparición de CPEO [12].

Mutaciones en genes que codifican proteínas mitocondriales

Suelen ser pequeñas deleciones puntuales en las proteínas que codifican las subunidades que forman los complejos de la cadena respiratoria, provocando una deficiencia del complejo del que forman parte. Algunas patologías causadas por estas mutaciones son la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), el Síndrome de Leigh y la retinitis pigmentosa (NARP). Estos desórdenes clínicos tienen como fenotipos característicos la neuropatía óptica (LHON), encefalopatía y acidosis láctica (Leigh), neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP) [9,12].

Mutaciones en genes nucleares

Se caracterizan por tener un patrón de herencia mendeliano y dan lugar a patologías análogas a las producidas por los genes mitocondriales. Muchos genes pueden verse afectados, desde subunidades estructurales de los complejos de la cadena respiratoria, factores de ensamblaje, chaperonas, hasta genes implicados en el mantenimiento, replicación y traducción del material genético mitocondrial.

Mutaciones que afectan al Complejo IV

Debido a que el objetivo de este trabajo de máster es el estudio de la terapia génica de enfermedades mitocondriales en las que se ve afectado el complejo IV, a continuación se explican con algo más de detalle las patologías asociadas al mismo. La deficiencia en

COX es uno de los defectos de la cadena respiratoria más común en humanos y se asocia con distintos fenotipos debido a causas genéticas heterogéneas. Las mutaciones en subunidades estructurales codificadas en el mtDNA que afectan al ensamblaje o estabilidad del complejo se asocian a un amplio rango de fenotipos incluyendo miopatía, MELAS, encefalomiopatía y fallo neuronal [36]. La primera mutación en una subunidad estructural codificada en el genoma nuclear fue descrita en dos casos de encefalopatía mitocondrial y deficiencia aislada en COX [37]. Hasta entonces, se pensaba que las mutaciones en proteínas estructurales nucleares del complejo IV eran incompatibles con la vida extrauterina.

En cuanto a las mutaciones en factores de ensamblaje de complejo IV se han descrito en varios de ellos, y también se dispone de modelos animales para el estudio de alguno de estos defectos. En el estudio en curso en el que se enmarca el proyecto de Máster se están utilizando dos modelos con defectos en el complejo IV causados por la eliminación de dos de estos factores de ensamblaje, Cox10 y Cox15. El gen COX10 codifica una hemo A:farnesiltransferasa, que cataliza el primer paso en la conversión de protohemo a hemo A del grupo prostético de la enzima, y se basa en la transferencia de un grupo farnesilo al grupo vinilo en posición dos del hemo B [38]. Por otro lado, el gen COX15 cataliza el segundo paso de la conversión a hemo A, que consiste en la hidroxilación del grupo metilo en posición ocho de la molécula protohemo [41]. En concreto, mutaciones en COX10 pueden determinar leucodistrofia y tubulopatía renal [38], síndrome de Leigh o cardiomiopatía hipertrófica infantil fatal [39, 40]. Mutaciones en COX15 también pueden causar cardiomiopatía hipertrófica infantil fatal [41] o síndrome de Leigh [42, 43].

1.10. Terapia de las enfermedades mitocondriales

Actualmente no existe una terapia efectiva para las enfermedades mitocondriales, y las estrategias disponibles son solo terapias paliativas. Entre ellas, la suplementación de la dieta (carnitina, CoQ, tiamina, succinato, ácido fólico), la eliminación de metabolitos nocivos (lactato), la administración de antioxidantes, el tratamiento de los síntomas mediante ejercicio, cirugía (implantes cocleares, trasplante hepático o cardíaco, corrección de ptosis) y el consejo genético. Algunas perspectivas terapéuticas actuales se basan en el aumento de la biogénesis mitocondrial, y por consiguiente el número de mitocondrias, mediante la estimulación de coactivadores de la transcripción mitocondrial [44]. Otra estrategia prometedora es la manipulación de la dinámica

mitocondrial, mediante agentes farmacológicos. Las mitocondrias tienen gran capacidad para fusionarse, dividirse y redistribuir los nucleoides, logrando incluso la complementación entre diferentes moléculas de mtDNA. Se ha propuesto que aumentando los procesos de fusión, podría alcanzarse una complementación funcional entre diferentes moléculas de DNA mitocondrial y al mismo tiempo, debido a la estrecha relación de este proceso de fusión con la autofagia, eliminar las mitocondrias que contienen elevados niveles de mtDNA mutante [45].

Otro grupo de aproximaciones terapéuticas proponen el uso de distintas estrategias de terapia génica como posible alternativa para el tratamiento de las enfermedades mitocondriales. Entre ellas encontramos la eliminación del gen mutante (mediante el uso de enzimas de restricción dirigidos a la mitocondria y que cortan específicamente las copias mutadas), la introducción del gen sano para su expresión en el citoplasma e importe a la mitocondria (expresión alotópica) y la xenoexpresión de enzimas alternativas (procedentes de otros organismos). Este último método se ha estudiado en el grupo de investigación GENOXPHOS como terapia para las enfermedades mitocondriales basada en el uso de vías alternativas al transporte electrónico en la cadena respiratoria y es el objeto de la presente memoria.

Las investigaciones desarrolladas en el estudio de las enfermedades mitocondriales se han dirigido hacia la obtención de líneas de ratones que porten mutaciones para dar lugar a fenotipos equivalentes a los de las distintas enfermedades mitocondriales humanas. Este esfuerzo investigador permitiría disponer de modelos para avanzar en el conocimiento de estas enfermedades y ensayar posibles aproximaciones terapéuticas. Se avanzaría así con respecto a los modelos más usados hasta ahora, basados en cultivos celulares derivados de tejidos procedentes de pacientes y que presentan muchas limitaciones.

Actualmente se dispone de estirpes de ratones portadores de mutaciones, creadas por técnicas de recombinación homóloga, para genes nucleares que codifican numerosos genes involucrados en funciones y estructuras mitocondriales, entre ellos las citadas que afectan al complejo IV. Aunque no es posible la creación de mutantes para genes individuales codificados en el mtDNA con las técnicas clásicas de mutagénesis aplicables al núcleo, se ha conseguido introducir mutaciones en el mtDNA siguiendo estrategias de fusión entre citoplastos (células enucleadas) que portan la mutación y, células madre embrionarias o cigotos. Estas mutaciones son heredables y afectan a las subunidades del complejo III, IV y tRNAs. Estos modelos, cuya obtención sigue siendo

un objetivo del grupo, servirían también para el ensayo de la estrategia de xenoexpresión.

La expresión de la oxidasa alternativa AOX podría proporcionar una opción en el caso de deficiencias que afecten a los complejos III y IV. Esta enzima ha sido expresada en células humanas sanas en cultivo, comprobando que su expresión no resulta tóxica y las hace parcialmente resistentes al cianuro y a la antimicina A, inhibidores de los complejos IV y III, respectivamente [46]. Dicha oxidasa alternativa permite la supervivencia de moscas que tienen disminuida parcialmente la expresión del factor de ensamblaje del complejo IV Surf1, así como compensar el fenotipo de una cepa de *Drosophila* que contiene una mutación en el gen homólogo al humano Park7 relacionado con la enfermedad del Parkinson [47].

La xenoexpresión simultánea de la proteína AOX y una NADH deshidrogenasa (NADH1) en una línea celular carente de mtDNA (rho cero o ρ^0) permitió restablecer el transporte electrónico desde NADH hasta oxígeno molecular [48]. Además de la función respiratoria, se restablecieron vías metabólicas adyacentes como la síntesis de pirimidinas. Sin embargo, no se recuperó el bombeo protónico, ya que ninguna de estas proteínas cumple esta función, por lo que la compensación funcional de la cadena respiratoria fue incompleta. Para restaurarla, y así establecer un potencial de membrana para la síntesis de ATP, se podría desarrollar una estrategia de xenoexpresión con proteínas con función de bombeo de protones.

La expresión de AOX en el modelo de ratón permite el estudio del potencial terapéutico de dicha proteína como terapia génica en mamíferos con defectos del sistema OXPHOS. Por ello, en el presente proyecto Máster se abordó el estudio de un modelo de ratón *knock-in* para AOX y del modelo resultante de cruzar dicho *knock-in* con animales *knock-out* para factores de ensamblaje del complejo IV de la cadena respiratoria (COX10 y COX15).

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

Nuestra hipótesis, basándonos en los resultados obtenidos *in vitro*, es que cuando la enzima monopectídica AOX se exprese en un animal que tenga interrumpida su cadena respiratoria a nivel de los Complejos III ó IV, restaurará el paso de electrones hasta el oxígeno, disminuyendo la producción de ROS y recuperando al mismo tiempo la actividad del Complejo I y de otras rutas metabólicas esenciales que dependen de dicha cadena y con ello mejorando la sintomatología.

2.2. Objetivos

1. Completar la caracterización funcional de AOX en los ratones *knock-in* comparando con el genotipo salvaje.
 - 1.1. Seguimiento en el tiempo para determinar la longevidad.
 - 1.2. Ensayos de respuesta al estrés térmico.
 - 1.3. Ensayos de respuesta a la dieta hiperlipídica.
2. Estudiar la posible compensación por AOX del fenotipo patológico en dos modelos *knock-out* para el complejo IV específicos de músculo (COX10 y COX15).
 - 2.1. Ensayos de actividad motora.
 - 2.2. Análisis de la actividad de la cadena respiratoria (complejo IV).
 - 2.3. Análisis de la expresión de la proteína AOX.
 - 2.4. Análisis histológico del músculo esquelético.

3. Material y métodos

Metodología general

En primer lugar se describen los métodos que se siguieron para la obtención de los ratones transgénicos, así como la extracción de DNA y mitocondrias de los mismos.

3.1. Muestras biológicas

Los ratones *knock-in* para AOX (KI AOX o KI) se generaron en varios pasos mediante ingeniería genética. El cDNA procedente del hongo *Emmericella nidulans*, fue recodificado e integrado en el genoma del ratón bajo la influencia del promotor Rosa26 que hace que su expresión sea constitutiva y ubicua. También se le añadió el epítipo de la Hemaglutinina del virus de la gripe al extremo carboxilo terminal para facilitar su inmunodetección y la resistencia a la neomicina para seleccionar los híbridos. El transgen contiene un cassette STOP flanqueado por sitios loxP, seguido del cDNA de AOX y un cassette de resistencia a neomicina que está flanqueado por sitios FRT (Figura 6A). Se introdujo el transgen en células madre embrionarias (ES) por recombinación homóloga en el locus Rosa26 y las células ES seleccionadas fueron inyectadas en blastocistos. Cruzando los ratones portadores del transgen con ratones que expresan Flp recombinasa se escindió el cassette de selección por el sistema de recombinación específica de sitio con el sistema Flp-FRT (flippase recognition target). Por último, cruzando los ratones portadores del transgén con ratones que expresaban Cre recombinasa (con un promotor Cre constitutivo), se produjo la recombinación específica de sitio en los sitios loxP, eliminando el cassette STOP (Figura 6A). Para el objetivo 1, las crías resultantes de estos cruces se genotiparon y caracterizaron como se describe más adelante.

Para la realización del segundo objetivo del presente proyecto se contó con dos modelos de ratones *knock-out* para las proteínas específicas del complejo respiratorio IV. El ratón *knock-out* para la proteína Cox10 (KO COX10) cedido por el Dr. Carlos Moraes (Univ. Miami-USA) y el ratón *knock-out* para la proteína Cox15 (KO COX15) cedido por el Dr. Massimo Zeviani (Istituto Carlo Besta, Milán), ambos presentan un severo defecto respiratorio.

El ratón *knock-out* COX10 se generó eliminando el exón 6 del gen con el sistema Cre-LoxP (Figura 6B) [49]. En el ratón KO COX15 se eliminaron los exones 1 y 2 (Figura 6C) [44]. En ambos casos los sitios loxP flanqueando el gen se introdujeron en células

ES por recombinación homóloga. Después se eliminó el cassette de selección con la Cre recombinasa para obtener el gen “floxeado”. Posteriormente, estas células ES se inyectaron en blastocistos para producir ratones quiméricos y así obtener una transmisión en línea germinal del gen “floxeado”. Por último, se escindió el gen *in vivo* cruzando el ratón “floxeado” con animales transgénicos que expresaban Cre recombinasa de forma específica en musculo esquelético [44, 49].

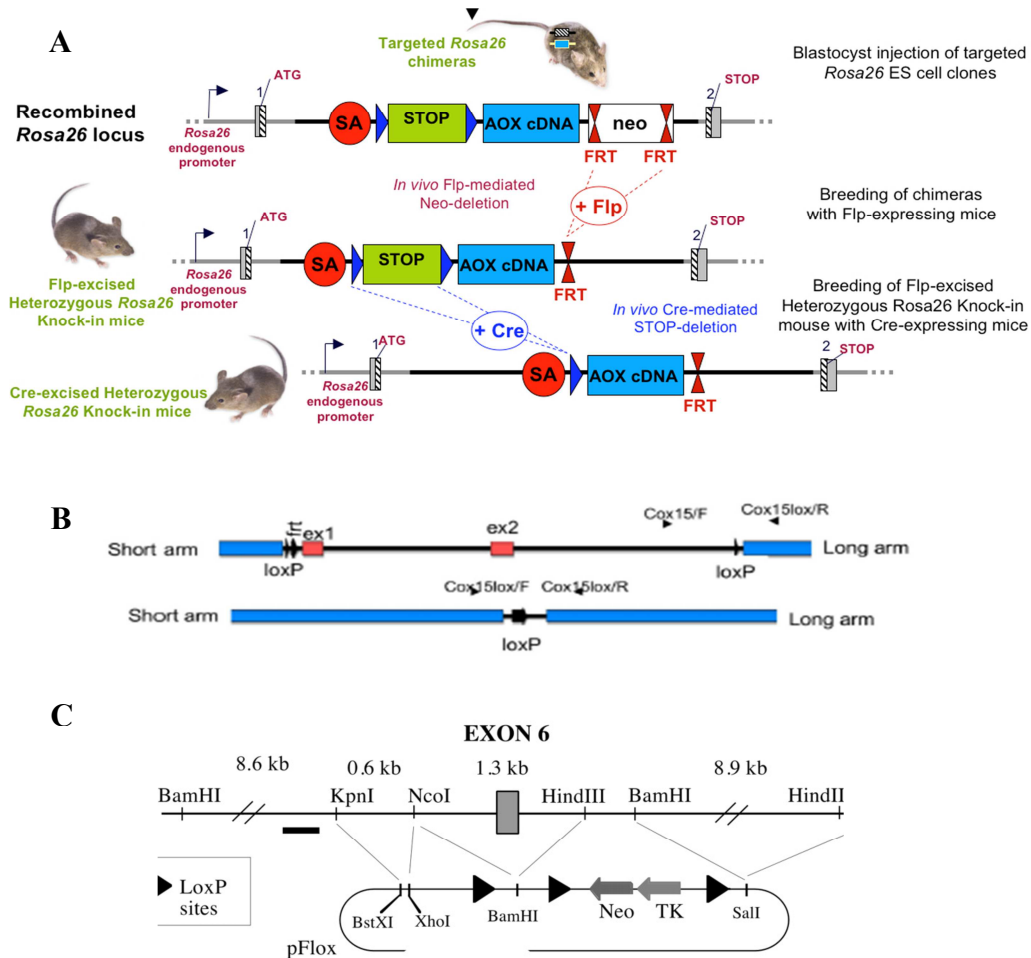


Figura 6. Generación del ratones transgénicos. A: Pasos que se siguieron para introducir el gen AOX. B: locus COX15 salvaje y eliminado del genoma por el sistema Cre-LoxP. C: locus COX10 y mapa de restricción con los sitios LoxP indicados con triángulos negros.

Ambas líneas de ratones *knock-out* se han cruzado con los ratones *knock-in* AOX para crear modelos *knock-in–knock-out* (KI-KO). Concretamente, los ratones con el transgen AOX se cruzaron con ratones que expresaban Cre de forma específica en músculo esquelético por un lado, y de forma independiente con ambos ratones KO para obtener las diferentes posibilidades que se muestran en los cruces representados en la Figura 7.

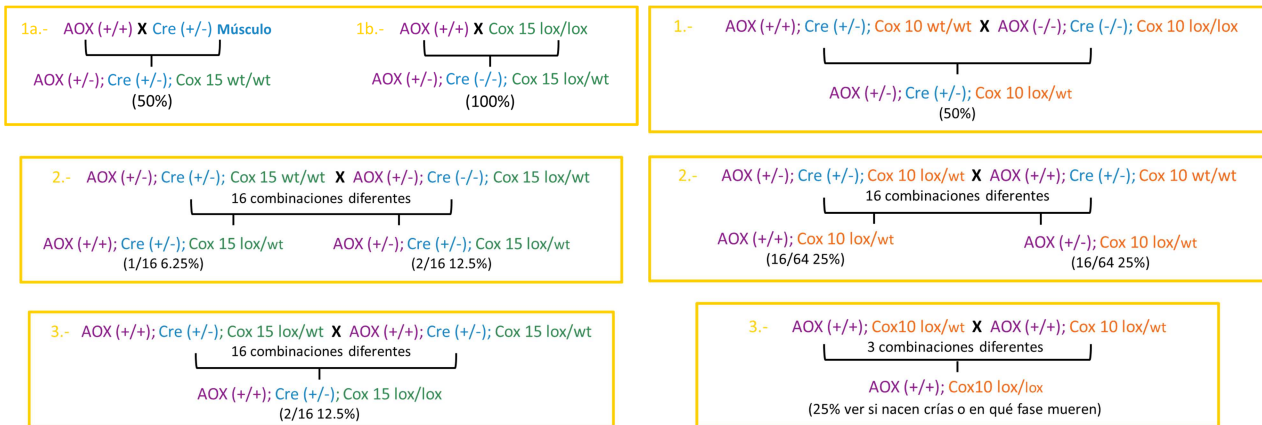


Figura 7. Cruces. Izquierda: Expresión AOX en miopatía COX15 (-/-) con recombinación por Cre específica de músculo (3 rondas de cruces = 6 meses). **Derecha:** Expresión constitutiva AOX en COX10 (-/-). Efecto en letalidad embrionaria (3 rondas de cruces = 6 meses).

Los ratones *knock-in* para AOX utilizados en este trabajo fueron criados en el animalario de la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza donde se han mantenido bajo condiciones de temperatura y humedad adecuadas. Los ratones *knock-out* KO COX10 y KO COX15 y los KI-KO resultantes del cruce de los primeros con el ratón KI AOX, fueron criados en el animalario del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) en colaboración con el grupo del Dr. José Antonio Enríquez.

3.2. Ácidos nucleicos para genotipado

Extracción de DNA de tejidos

El genotipado de los ratones utilizados en nuestro trabajo se realizó siguiendo el protocolo de extracción de DNA cedido por Mark Strunk, técnico superior del Servicio Científico Técnico de Genómica Funcional del IACS. Las muestras correspondían a dedos de las crías que venían en tubos Eppendorf procedentes del animalario de la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza. A cada muestra se le añadió 50 µl de solución de lisis alcalina (25 mM NaOH y 0,2 mM EDTA) y se agitaron en un vortex, seguidamente se centrifugaron unos segundos en microcentrífuga y se incubaron primero a 65°C durante 30 minutos y después a 98°C durante otros 15 minutos. A continuación, se dejaron en un baño de hielo durante 5 minutos, se volvieron a centrifugar unos segundos y a cada muestra se añadió 50 µl del reactivo de neutralización (40 mM de Tris-HCl a pH=4) y se agitaron en un vortex, seguidamente se centrifugaron durante un minuto en microcentrífuga a 14000 xg. El último paso fue

tomar 80 µl del sobrenadante con mucho cuidado de no arrastrar nada de la fase inferior en la que quedaban los restos procedentes de la digestión y el tejido biopsiado, y se pasaron a nuevos tubos Eppendorf correctamente etiquetados y estériles que se almacenaron hasta su uso a -20°C.

La extracción de DNA a partir de homogenado de tejido tras el sacrificio de los ratones se realizó por el siguiente método. Con el fin de extraer DNA total procedente de cada órgano se añadió al tejido cortado tampón de digestión a una concentración de 12 µl/mg tejido (10 mM Tris-HCl pH=8, 25 mM EDTA pH=8, 100 mM NaCl y 0,5% SDS) y se trataron con proteinasa K para una concentración final de 0,1 mg/ml. Esta mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche con agitación. A continuación se añadió Ribonucleasa A a una concentración final de 10 µg/ml, y se incubó a 37°C durante 60 minutos o a 60°C durante 15 minutos y se procedió a realizar las extracciones. Primero se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vortex 15-30 segundos y se centrifugó en microcentrífuga a 10000 xg 5 minutos. Tras pasar la fase acuosa (superior) a otro tubo se extrajo con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se volvió a agitar en vortex 15-30 segundos y se centrifugó en microcentrífuga a 10000 xg 5 minutos. Se volvió a recoger la fase acuosa y se precipitó con 1/2 volumen de acetato de amonio 7,5 M y dos volúmenes de etanol 99% frío. Una vez mezclado por inversión se incubaron las muestras a -20°C durante toda la noche o a -80°C durante 3 horas. Después de centrifugar durante 30 minutos a 13000 xg, se eliminó el etanol por decantación, se lavó con 500 µl de etanol 70%, se decantó y el pellet se resuspendió en agua destilada (Gibco).

Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de los ácidos nucleicos obtenidos a partir de los métodos anteriormente citados, se determinó mediante espectrofotometría visible ultravioleta (VIS-UV) con ayuda de un sistema NanoVue Plus (GE Healthcare) (Figura 9).

Antes de su uso se debe calibrar el aparato, para ello se cargaron 2 µl de agua destilada repitiéndose la operación dos veces, para verificar el valor cero de absorbancia. Una vez calibrado el aparato, se cargaron 2 µl de muestra a cuantificar en la zona de carga y el aparato determinó la concentración en ng/µl y las relaciones de pureza según la absorbancia a la longitud de onda a la que absorben ácidos nucleicos y proteínas.



Figura 9. Espectrofotómetro NanoVue. **Izquierda:** espectrofotómetro empleado para cuantificar ácidos nucleicos en pequeños volúmenes. **Derecha:** detalle de la zona de carga de la muestra en el lector

Amplificación del DNA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador (Biometra, T3000) (Figura 10A) con el fin de obtener gran cantidad de un fragmento de DNA determinado, con la ayuda de una DNA polimerasa termoestable (SuperHot *Taq* polimerasa, de *Thermus aquaticus*), y así poder realizar el genotipado de los ratones con los que se trabajó durante el proyecto. El programa de PCR varía en temperaturas y tiempos según el genotipado que se realiza (Figura 10B).

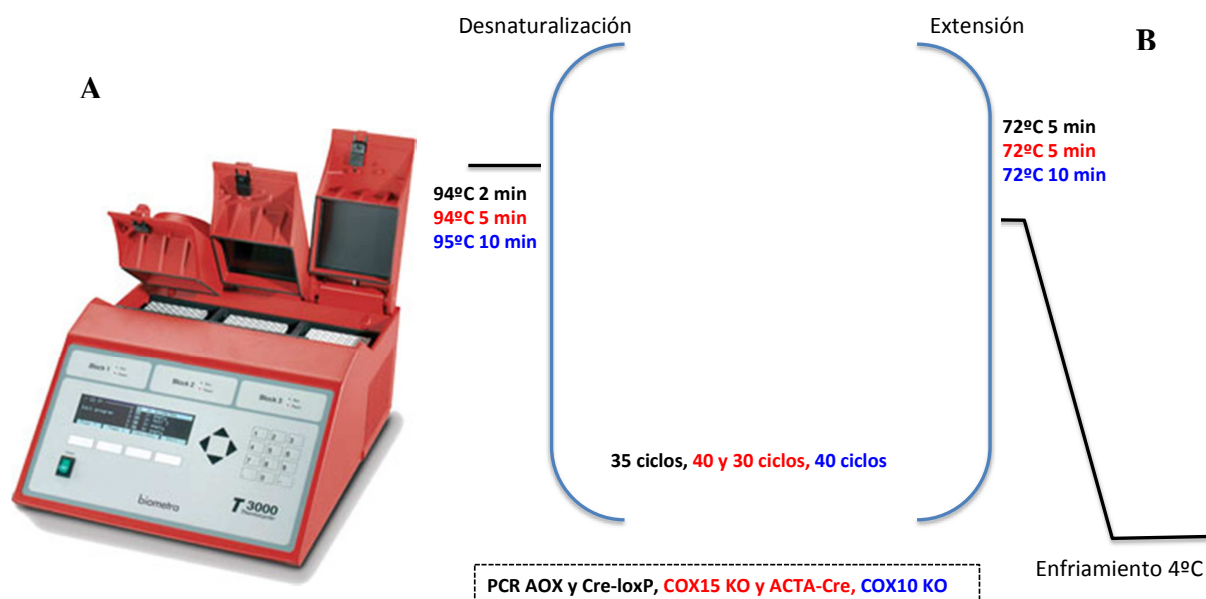


Figura 10. A: Termociclador utilizado para amplificar DNA. **B:** programas de PCR con sus diferentes temperaturas, tiempos y ciclos.

En la PCR se utilizó como molde el DNA extraído de las muestras de dedos para los genotipados de las crías nacidas en el animalario, y de los diferentes tejidos tras el sacrificio de los animales. Se añadieron 100 ng de DNA total a una mezcla de reacción de 25µl de volumen final. La PCR AOX se utilizó para identificar ratones transgénicos para AOX en tejidos que se producía recombinación porque tenían Cre recombinasa y por tanto carecían de cassette STOP, mientras que la PCR Cre-LoxP servía para

identificar los KI AOX en tejidos que carecen de Cre (no se elimina el cassette STOP). La PCR ACTA-Cre identificó la presencia del gen de la Cre recombinasa en músculo esquelético de los ratones transgénicos. Por último, las PCR COX15 KO y COX10 KO se diseñaron para identificar el correspondiente gen “floxeado”. Las características de cada PCR se detallan en la Tabla 2 y los cebadores empleados se recogen en la Tabla 3.

| | AOX | Cre-LoxP | COX15 KO | COX10 KO | ACTA-Cre |
|---|--|--|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Utilidad | Identificar KI AOX sin STOP: +/+, +/- o WT | Identificar KI AOX con STOP: +/+, +/- o WT | Identificar KO COX15: -/- | Identificar KO COX10: -/- | Identificar KI ACTA-Cre |
| Tª hibridación t extensión Nº ciclos | Tª: 60°C t: 60’’ 35 ciclos | Tª: 58°C t: 90’’ 35 ciclos | Tª: 56°C t: 30’’ 30 ciclos | Tª: 60°C t: 1’ 40 ciclos | Tª: 56°C t: 30’’ 30 ciclos |
| Tejido | Sin cassette STOP: músculo esquelético | Con cassette STOP: diferentes de músculo esquelético | Músculo esquelético | Músculo esquelético | Músculo esquelético |
| Resultado | 711pb +/+ 400pb WT 711+400pb +/- | 850pb +/+ 400pb WT 850+400pb +/- | 500pb -/- | 838pb -/- 708pb WT | 230pb +/+ |

Tabla 2. Características de las PCR. +/+ homocigoto KI para el gen AOX, +/- heterocigoto AOX y WT genotipo salvaje. -/- homocigoto KO COX10 o COX15. En resultado se indica el tamaño esperado de los productos de PCR identificados mediante electroforesis en gel de agarosa.

| | Oligos Directos | Oligos Reversos |
|-----------------|--|--|
| AOX | CACTTGCTCTCCCAAAGTCGCTCT | CTCCACGATCTTTGGGGCGTCTG GCGGATCACAAGCAATAATAACCTG |
| Cre-LoxP | CACTTGCTCTCCCAAAGTCGCTCT GTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGT | GCGGATCACAAGCAATAATAACCTG |
| COX15 KO | ATCCACGCCTGTTTCCGC | CCATTGAGCCCTACATAATACCAGC |
| COX10 KO | ACCCATTAGAACTGCTGATGGCT | CACTGACGCAGCGCCAGCATCTT |
| ACTA-Cre | CGCAGAACCTGAAGATGTTC | GTTCTGACGCTAGAGCCTG |

Tabla 3. Oligos. Oligonucleótidos empleados en cada una de las reacciones de amplificación del DNA.

Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Los geles se prepararon disolviendo agarosa al 1,8% en tampón de electroforesis TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM), a 60–70°C. Posteriormente, se añadió bromuro de etidio (10 mg/ml) hasta una concentración final de 0,5 µg/ml, se mezcló cuidadosamente y se vertió en el molde del gel, se colocó el peine y se dejó gelificar por enfriamiento. Para cargar las muestras en el gel, estas se mezclaron con 1/3 del volumen de colorante (Ficoll400 al 30% y azul de bromofenol al 0,1% (p/v) en TAE

1x). Como marcador de pesos moleculares se utilizó Low Mass Ladder de Invitrogen. La electroforesis se desarrolló en tampón TAE, aplicando un voltaje de 90 V, durante 30 minutos aproximadamente. El gel, tras la electroforesis, se visualizó en un transiluminador de geles GelDoc de Bio-Rad.

3.3. Purificación de mitocondrias de tejidos de ratón

La extracción de mitocondrias de órganos de ratón (corazón, cerebro, hígado y músculo, concretamente músculo esquelético vaso lateral e intermedio, gastrocnemio y soleo), se realizó para llevar a cabo la inmunodetección de AOX y la medida de la actividad del complejo IV en la cadena de transporte de electrones.

Tras el sacrificio del animal por dislocación cervical, se extrajeron los órganos y colocaron en tubos con medio A frío estéril (sacarosa 0,32 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=7,4) y se pesaron. Después se trocearon finamente con unas tijeras y se lavaron con medio A para eliminar una mayor cantidad posible de sangre y grasa.

A continuación se homogeneizaron los distintos órganos en medio A: 4 ml/g de hígado, 5 ml/g de cerebro o 10 ml/g de corazón y músculo. La homogenización se realizó en potter tipo Elvehjem con émbolo de teflón rotando a 600 rpm y el número de pases varió dependiendo del tejido desde 4 en hígado, hasta 10 o más en cerebro, corazón y músculo. Parte del homogenado tisular se pasó a un tubo Eppendorf y se almacenó a -80°C para su uso en experimentos de inmunodetección. El resto del homogenado se transfirió a tubos de fondo redondo de plástico, de NALGENE y se centrifugaron a 3000 xg durante 5 min a 4°C en un rotor basculante (rotor JA25.50 Beckman-Coulter).

Mitocondrias para inmunodetección de AOX

En hígado, parte del sobrenadante resultante de la centrifugación a 300 xg fue transferido a tubos Eppendorf y se centrifugó en microcentrífuga (Eppendorf 5415R) a 13000 xg durante 2 min a 4°C. El sedimento resultante se resuspendió en medio A, juntando el contenido de dos tubos en uno y se centrifugó en las mismas condiciones. Esta operación se repitió hasta tener todo el contenido original en un solo tubo.

En el resto de tejidos, parte del sobrenadante se pasó a un nuevo tubo de fondo redondo de plástico para volver a centrifugar a 9000 xg durante 10 minutos a 4°C. El precipitado resultante se resuspendió en 2-5 ml de medio A, se pasó a 4 tubos Eppendorf y se centrifugó en microcentrífuga (Eppendorf 5415R) a 13000 xg durante 2 min a 4°C. El sedimento resultante se resuspendió en medio A, juntando el contenido de dos tubos en

uno y se centrifugó en las mismas condiciones. Esta operación se repitió hasta tener todo el contenido original en un solo tubo.

En todos los tejidos, una vez obtenido el pellet mitocondrial final, se realizó un lavado en medio MAITE frío y estéril (Sacarosa 25 mM; Sorbitol 75 mM; KCl 100 mM; EDTA-Na 0,05 mM; MgCl₂ 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH=7,4; y H₃PO₄ 10 mM, pH=7,4) centrifugándose de nuevo a 13000 xg, durante 2 min a 4°C en microcentrífuga. El pellet se resuspendió en 100-500 µl de tampón RIPA frío y estéril (Tris-HCl 50 mM pH=7,4, NaCl 50 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, EDTA 5 mM) que contenía inhibidores de proteasas (cocktail SIGMA) para su conservación (-80°C) evitando una degradación excesiva.

Mitocondrias para medidas de actividad en espectrofotómetro

Parte del sobrenadante resultante de la centrifugación a 300 xg fue transferido a tubos Eppendorf y se centrifugó en microcentrífuga (Eppendorf 5415R) a 100 xg durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se separó y se almacenó a -80°C.

Metodología para la caracterización funcional del ratón AOX

En estudios previos del grupo GENOXPHOS se ha demostrado la inocuidad de AOX en el ratón. Ahora, con el fin de completar el estudio funcional del ratón AOX se analizaron sus posibles beneficios asociados a la disminución del daño oxidativo. Todas las pruebas se realizaron en el animalario de la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza.

3.4. Seguimiento de longevidad

Este estudio inició en 2011 con un total de 22 ratones, 11 hembras y 11 machos. El grupo de las hembras estaba compuesto por 5 animales de genotipo homocigoto para AOX (+/+) y 6 de genotipo salvaje o wild type (-/-), y el de los machos por 6 de genotipo homocigoto para AOX (+/+) y 5 de genotipo salvaje (-/-).

Los ratones pueden llegar a vivir más de dos años en condiciones de laboratorio, mientras que la misma especie en la naturaleza no vive más de un año de media. Por ello muchos de los ratones incluidos están todavía en seguimiento.

Este es el segundo grupo sometido a estudio de envejecimiento, siendo el primero el que formó parte del anterior trabajo de máster del grupo de investigación, en el que se incluyeron también heterocigotos para AOX (+/-).

3.5. Ensayos de respuesta al estrés térmico

La telemetría, sistema de medida de magnitudes físicas, se realizó mediante el sistema Data Sciences International (DSI) Physiotel. A los animales se les implantó un transmisor subcutáneo que permite monitorizar varios parámetros cuando los animales están dentro de sus cajas. En este caso a los ratones se les midió la temperatura corporal y la actividad en respuesta al estrés térmico causado por bajas temperaturas (4°C). Los experimentos se realizaron durante la noche (19-7h) tanto en condiciones de ayuno como de alimentación. Se estudiaron 16 machos en total, 8 homocigotos para AOX (+/+) y 8 de genotipo salvaje, a los que se les realizaron medidas de actividad y temperatura cada minuto durante 12 horas, mientras los ratones permanecían dentro de un cuarto frío a 4°C. Se tomaron los datos de cada media hora para manejar el gran volumen de datos.

3.6. Ensayos de respuesta a dieta hiperlipídica

Para analizar la obesidad inducida por la dieta se realizaron dos experimentos. El primero con 66 ratones macho adultos (10 semanas de edad): 12 de genotipo salvaje, 7 heterocigoto para AOX (+/-) y 15 KI AOX. El segundo con 31 crías macho (4 semanas de edad): 10 de genotipo salvaje, 8 heterocigoto para AOX (+/-) y 7 KI AOX. Al grupo de adultos se le proporcionó dos dietas experimentales diferentes; la dieta hiperlipídica (ssniff D12492) y la dieta control (ssniff D12450B), que contenían 60% y 13% de lípidos respectivamente (Tabla 1) y al segundo grupo únicamente dieta hiperlipídica. La dieta hiperlipídica está pensada para inducir obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico, mientras que la control es normolipídica y baja en carbohidratos simples.

| Nutrientes | Dieta hiperlipídica | | Dieta control | |
|---------------|---------------------|------|---------------|-----|
| | g | % | g | % |
| Carbohidratos | 31,3 | 21 | 63,3 | 67 |
| Almidón | 0,5 | 0,4 | 37,7 | 7,2 |
| Azúcares | 9,5 | 7,3 | 9,8 | 7,5 |
| Dextrinas | 15,3 | 11,8 | 9,8 | 7,5 |
| Fibra | 6 | 1,4 | 6 | 1,4 |
| Lípidos | 34,6 | 60 | 5,1 | 13 |
| Proteínas | 24,1 | 19 | 18,2 | 20 |

Tabla 1. Composición nutricional de las dietas. Los nutrientes de las dietas hiperlipídica y control se muestran en porcentaje en peso (g por cada 100 g de producto) y porcentaje de energía metabolizable.

Metodología para el análisis de la compensación del fenotipo patológico

Para llevar a cabo el segundo objetivo, estudiar la posible compensación por AOX del fenotipo patológico en dos modelos *knock-out* para el complejo IV específicos de músculo (COX10 y COX15), se realizaron medidas de actividad motora con los animales, mientras que con las muestras biológicas tras el sacrificio se analizó la actividad del complejo IV, la expresión de proteína AOX y la morfología histológica.

3.7. Medidas de actividad motora

Se llevaron a cabo estudios de comportamiento en animales vivos con ratones de genotipo salvaje (n=10), KI (n=7), KO (n=15) y KI-KO (n=13) para comparar su función motora y diferenciar el fenotipo sano del enfermo. Estos ensayos medían la coordinación, fuerza y actividad basal de los ratones y se realizaron en el Servicio Científico Técnico de Valoración Funcional del IACS.

En el ensayo de coordinación se hizo correr a los ratones dos veces por semana hasta un total de 12 pruebas en un RotaRod (Panlab) (Figura 8) durante 3 minutos a 15 rpm y se registró el número de caídas de cada animal en ese intervalo de tiempo. Antes de someter a los ratones a la prueba se les entrenó durante 10 días en el RotaRod a la misma velocidad y tiempo que se usarían en la prueba. Transcurrido el periodo de entrenamiento en el cual los ratones se acostumbran al aparato, se les dejó descansar una semana, tras la cual se empezaría a realizar la prueba semanalmente.

En el ensayo de fuerza se hicieron dos experimentos para los cuales no se requería entrenamiento. Uno de ellos medía la fuerza de agarre mediante el Grip-Strength Meter (UGO Basile), que tiene un sensor de fuerza conectado a un amplificador (Figura 8). Los ratones se colocaron sobre la reja y se registró la fuerza de cada animal al tirar de la cola del ratón, el cual se agarra a la barra con fuerza hasta soltarse. Una vez se ha soltado el equipo da una lectura registrando la fuerza máxima ejercida por el ratón. Se realizó 12 veces por animal, dos veces por semana, y se hizo una media de los resultados obtenidos. Además, se registraron el valor máximo y la desviación estándar. En el segundo experimento de fuerza de agarre los ratones se situaron sobre la rejilla de una caja, se le dio la vuelta y se midió el tiempo que los ratones tardaban en caer. Si pasados 2 minutos los animales no caían, se consideró que habían superado la prueba, la cual se realizó 12 veces por animal en 6 semanas. Se considera que un ratón sano puede

aguantar los dos minutos en la reja, estableciéndose así una escala de fuerza entre los ratones con debilidad muscular.

Por último, se realizó un ensayo de campo abierto (Figura 8) en Open-Field box (Panlab). Este consiste en medir la actividad basal global del ratón en un ambiente desconocido. Para ello se colocó al ratón en el centro del cubículo y se registró y grabó su movimiento durante 15 minutos con la cámara situada encima de la caja. Entre cada ratón se limpió el equipo para evitar que quedase cualquier olor o resto del anterior animal y pudiese interferir en su forma de moverse. El programa de análisis registra múltiples datos que pueden analizarse y compararse posteriormente.

Los datos que se utilizaron para comparar los diferentes genotipos se describen a continuación. En los ensayos de campo abierto se analizó el promedio de los movimientos rápidos y lentos, con desplazamiento y estáticos. Para el resto de ensayos, al ser 12 pruebas totales, se calculó la media para cada animal, y luego se compararon los promedios de cada genotipo.



Figura 8. Ensayos de actividad motora. De izquierda a derecha: ensayo de coordinación (rotarod), fuerza de agarre (rejilla) y campo abierto (campo abierto).

3.8. Actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) por espectrofotometría

La actividad de la citocromo c oxidasa se mide como disminución de la absorbancia a 550 nm debido a la oxidación del citocromo c reducido ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) por parte del complejo IV. La reacción se siguió durante 2 minutos a 38°C. Este protocolo se utilizó usando mitocondrias aisladas a partir de homogenados celulares totales. Las muestras se sometieron al método de *freeze-thawing* para la lisis celular. Para ello se congelaron las muestras biológicas en nitrógeno líquido o en hielo seco y se descongelaron rápidamente a 37°C. Para lisar las células se necesitan varios ciclos de congelación-descongelación que hacen que se hinchen y encojan, hasta que la membrana celular se rompa debido a los cristales que se forman en el interior durante el proceso de

congelación.

Los reactivos necesarios para preparar 100 ml de tampón KP (Hidrogenofosfato potásico 100mM pH=7) fueron: 38,5 ml de K_2HPO_4 100 mM y 61,5 ml de KH_2PO_4 100 mM, ajustando el pH. El citocromo c se debe preparar en fresco antes de las medidas. Para preparar 1,5 ml citocromo c reducido 1%, se pesaron 15 mg de citocromo c que se resuspendieron en 1 ml de tampón KP 10 mM pH=7. Para reducir el citocromo se añadió una punta de espátula de $NaBH_4$. La mezcla se agitó y se mantuvo en hielo 30 minutos. El pH se ajustó con pHmetro (Crison, pH-Meter Basic 20⁺) a 7-7,3 con HCl 1N. Se completó con agua destilada hasta 1,5 ml. La disolución se mantuvo en hielo todo el rato.

Las medidas se realizaron en placa de 96 pocillos en un lector de microplacas (Espectrofotómetro-Fluorímetro-Luminómetro Biotek Sinergy HT SIAFRD). El volumen total de reacción fue de 200 μ l: 158 μ l de agua destilada, 20 μ l de tampón KP 100 mM, 2 μ l de homogenado total y 20 μ l de citocromo c reducido (1% en tampón KP 10 mM pH=7).

La actividad del complejo IV se corrigió por cantidad de proteína, determinada por el método Bradford. Los valores corresponden a unidades internacionales por litro ($nmol \cdot min^{-1} \cdot \mu g \text{ proteína}^{-1}$).

3.9. Expresión de proteína AOX

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la concentración proteica en homogenados tisulares totales o en mitocondrias aisladas se llevó a cabo por espectrofotometría, utilizando el método de Bradford (Bradford 1976) y el espectrofotómetro UV-VIS (Unicam, UV 500 y software Vision32 versión 1.05).

Para ello, se elaboró una curva de calibrado, formada por 6 diluciones patrón que contenían: 1, 3, 5, 10, 15 y 20 μ g de seroalbúmina bovina (BSA), respectivamente. Las muestras, diluidas o no, se midieron por triplicado. Tanto las muestras, como los patrones y blancos, se llevaron a un volumen final de 800 μ l en agua mili-Q y se les añadieron 200 μ l del reactivo Bradford concentrado (Bio-Rad Protein assay). Se dejó desarrollar el color durante al menos 5 minutos (máximo una hora) y, finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Con los valores de absorbancia de las diluciones patrón, se construyó una recta de

calibrado. Con la ecuación de esta recta de calibrado, se relacionó la absorbancia de las muestras con su concentración de proteína.

Electroforesis de proteínas

La separación electroforética de las proteínas se llevó a cabo mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). El sistema que se utilizó para realizar este experimento fue Mini Protean III de Bio-Rad (Figura 11A). El porcentaje del gel concentrador fue siempre del 5% y el del gel separador del 12,5% (Tabla 3).

| | Poliacrilamida (30:0,8) | Tampón 4x Tris-HCl | H₂Odestilada | APS 20% | TEMED |
|------------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------|--------------|
| Separador 12,5% | 2,08 ml | 1,25 ml | 3 ml | 15 ml | 5 ml |
| Concentrador 5% | 0,33 ml | 0,5 ml | 2,3 ml | 10 ml | 5 ml |

Tabla 3. Disolución poliacrilamida: acrilamida 30%:bisacrilamida 0,8% (p/v). Tampón de electroforesis 10x: Tris-HCl 250 mM, glicina 1,92M, SDS 1%(p/v). Tampón gel separador 4x: Tris-HCl 1,5M (pH=8,8), SDS 0,4%, EDTA 8 mM. Tampón gel concentrador 4x: Tris-HCl 0,5M (pH=6,8), SDS 0,4%, EDTA 8 mM. Tampón de carga 4x: Glicerol 10%, Tris-HCl 50 mM (pH=6,8), SDS 2%(p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v), β -mercaptoetanol 1% (v/v).

El gel separador se vertió entre los cristales que forman el soporte, dejando unos 2 cm para el gel concentrador. A continuación se añadió una fina capa de isopropanol para favorecer la formación del frente y evitar la posible entrada de oxígeno, que dificultaría la polimerización. Una vez polimerizado el gel, se eliminó el exceso de isopropanol y se lavó su superficie con agua destilada. Tras retirar el exceso de agua con un papel secante, se vertió el gel concentrador. Finalmente, se insertó el peine con cuidado y se esperó la polimerización del gel concentrador. Cuando polimerizó, se quitó el peine y antes de cargar las muestras, se limpiaron los pocillos con agua destilada para retirar los restos de acrilamida y SDS. La cubeta se llenó de tampón de electroforesis 1x y se procedió a cargar las muestras, mezcladas con tampón de carga y el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color de Bio-Rad. La electroforesis se desarrolló a una intensidad de corriente constante de 10 mA hasta que las muestras alcanzaron el gel separador, momento en el que se subió la intensidad de corriente a 20 mA hasta que las muestras llegaron a la altura deseada, lo que se pudo controlar gracias a la posición de las bandas del marcador.

Transferencia de proteínas a membrana

La transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente a membranas de PVDF se realizó mediante electrotransferencia utilizando el sistema Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad (Figura 11B). Para ello se cortó un trozo de membrana de PVDF (Hybond-P de Amersham) adecuado al tamaño del gel a transferir, se incubó en metanol durante 10 segundos, se lavó con agua destilada durante 5 minutos y finalmente se equilibró durante 10 minutos en el tampón de transferencia (BSN: Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v)). Simultáneamente, el gel se sumergió en el mismo tampón durante 20 minutos.

El sándwich del aparato de transferencia se montó sumergido en tampón de transferencia, siguiendo las indicaciones del fabricante (Figura 11C). Las esponjas y papeles de filtro se humedecieron en BSN antes de colocarse y la transferencia se realizó a 4°C a 100V durante 2 horas o a 30V durante toda la noche.

Una vez terminada la transferencia, se dejó secar la membrana a temperatura ambiente y seguidamente las proteínas se fijaron a la misma sumergiéndola en metanol durante 10 segundos. La membrana se lavó con PBS-T y se utilizó inmediatamente para la detección o se conservó envuelta en film de plástico a 4°C hasta su uso.

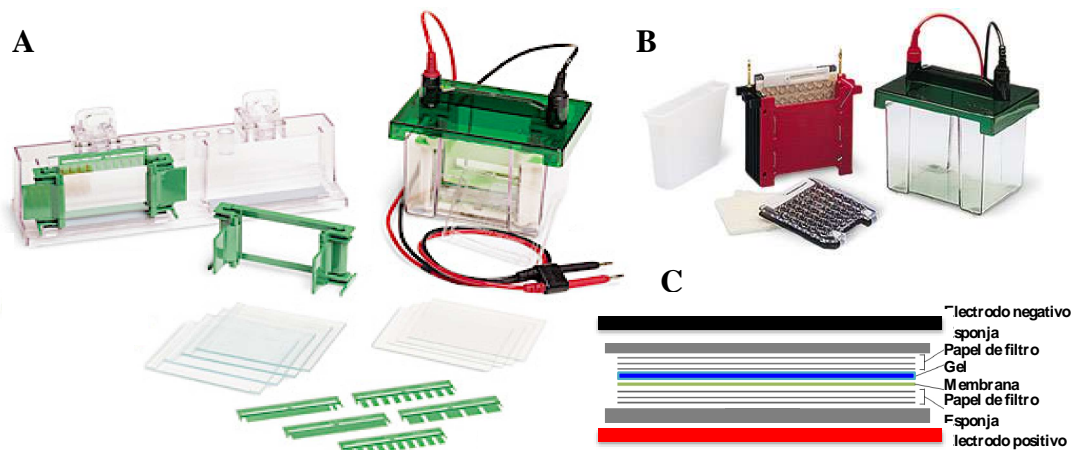


Figura 11. A: Mini Protean III de Bio-Rad, B: Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad y C: ensamblaje del sándwich para la transferencia.

Inmunodetección de proteínas

Antes de empezar la primera incubación, la membrana se lavó con PBS-T (Tween 20 al 0,1% en PBS) durante el tiempo necesario para su rehidratación y todas las incubaciones y lavados para la inmunodetección de proteínas mediante Western-Blot se realizaron con agitación (agitador horizontal, ELMi DOS-20M).

Lo primero que se hizo fue bloquear la membrana para eliminar los posibles sitios de unión inespecíficos de la misma. Para ello, se incubó la membrana en una disolución de leche desnatada en polvo al 12% en PBS-T y 4 mg/ml de BSA durante al menos una hora a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Seguidamente, se eliminó el exceso de agente bloqueante mediante un lavado con PBS-T de 5 minutos.

Para la inmunodetección de la proteína AOX, el primer anticuerpo HA-peroxidasa (que no precisa de anticuerpo secundario) se diluyó en la proporción adecuada (Tabla 4) en una disolución de PBS-T con 1% de leche desnatada en polvo y 2,5 mg/ml BSA. La incubación de dicho anticuerpo se dejó 2 horas a temperatura ambiente, o a 4°C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS-T, y la membrana ya estaba lista para la detección de proteínas.

Para la inmunodetección de las proteínas control, se requirió el uso de anticuerpo primario y secundario. Se incubó la membrana en una disolución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T al menos 1 hora, o a 4°C toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el exceso de agente bloqueante con un lavado de 5 minutos de PBS-T. El anticuerpo primario comercial (Anti-Actina) se diluyó en la proporción adecuada (Tabla 4) en una disolución de PBS-T con 0,5% de leche desnatada en polvo. La incubación se dejó 2 horas a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Pasado ese tiempo, la membrana se lavó con PBS-T tres veces durante 10 minutos. El anticuerpo secundario (anti IgG de conejo) se diluyó a la proporción adecuada (Tabla 4) en 0,5% de leche desnatada en polvo disuelta en PBS-T y se incubó la membrana con él durante 1 hora. Finalmente, se eliminó esta última disolución y se procedió a los tres últimos lavados de 10 minutos con PBS-T.

| | Anticuerpo primario (dilución) | Proteína diana | Anticuerpo secundario (dilución) | Casa Comercial |
|---------------------------|---|---------------------------|---|---------------------------|
| HA- peroxidasa | HA peroxidasa (1:5000) | Epítipo HA | * | Roche |
| Control Actina | Anti-actina (1:5000) | β -Actina | Anti-conejo (1:6.000) | SIGMA |

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en la inmunodetección de proteínas mediante Western Blot. El anticuerpo HA-peroxidasa tiene como diana el epítipo de la hemaglutinina (HA). * No precisa de anticuerpo secundario, está conjugado con la peroxidasa de rábano.

La detección de la proteína de interés se realizó mediante la reacción de la enzima peroxidasa de rábano, conjugada al anticuerpo, al entrar en contacto con el luminol como sustrato quimioluminiscente, para ello se utilizó el kit comercial EZ-ECL (Biological Industries).

La membrana, incubada con los anticuerpos correspondientes, se incubó durante tres minutos con el sustrato quimioluminiscente y la luz emitida en dicha reacción se detectó al exponer la membrana, envuelta en un film transparente de plástico, a una placa autorradiográfica (Amersham, Hyperfilm) en un cassette de exposición, durante el tiempo adecuado. Pasado el tiempo de exposición, se usó el líquido revelador y fijador (SIGMA-ALDRICH, Kodak). Primero se sumergió la placa en el líquido de revelado de Kodak durante no más de 2 minutos (controlando la aparición de señal), después se lavó unos segundos en agua destilada, en segundo lugar se fijó sumergiéndola 1 minuto en el fijador Kodak y finalmente se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Cabe destacar, que todo este proceso se realizó en cuarto oscuro.

Con el fin de eliminar los anticuerpos unidos a las proteínas fijadas en la membrana y poder volver a reutilizarla en otra inmunodetección, la membrana se sumergió en una solución stripping (2-mercaptoetanol 100mM, SDS 2%, Tris-HCl 1M, pH=6,7) y se incubó durante 30 minutos a 58°C, con agitación ocasional, lo que permite la desnaturalización de los anticuerpos. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con PBS-T y a partir de ese momento, la membrana estaba lista para ser reutilizada.

3.10. Análisis histológicos

Los análisis morfológicos se realizaron en el Servicio Técnico de la Unidad de Anatomía Patológica del IACS. Se tomaron muestras de secciones longitudinales y transversales de músculo esquelético de ambas extremidades posteriores de un total de 22 ratones: 5 de genotipo salvaje, 4 KI AOX, 4 KO y 9 KI-KO.

Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 4% a 4°C, procesadas de forma rutinaria hasta su inclusión en parafina, cortadas a 3 µm y teñidas con el método de Hematoxilina-Eosina (HE) para su valoración histopatológica. Este método consiste en aplicar la tinción de hematoxilina, que al ser catiónica o básica tiñe estructuras ácidas en tonos azul y púrpura, y la eosina que tiñe componentes básicos en tonos de color rosa gracias a su naturaleza aniónica o ácida.

El análisis anatomopatológico de tejido muscular por el método HE permite comprobar alteraciones morfológicas y con ello determinar la condición de los ratones de distinto genotipo ya que tiñe fibras musculares y núcleos de diferente color, pudiéndose analizar su distribución, número y morfología y compararla con los ratones control.

Metodología estadística

Con el fin de interpretar los datos obtenidos en el proyecto Máster se hizo uso de análisis estadísticos.

3.11. Análisis de datos

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS version 20.0; Chicago, IL, USA) y los datos y figuras se procesaron con las hojas de cálculo de Microsoft Excel (Reading, UK).

El estudio de la caracterización funcional del ratón AOX incluyó el seguimiento de longevidad, la respuesta al estrés térmico y a la dieta hiperlipídica. Para la longevidad se analizaron los valores de días de vida, mientras que en el ensayo de respuesta al estrés térmico se utilizaron la temperatura y actividad a lo largo del tiempo. Estos ensayos incluyeron dos genotipos (el salvaje y el homocigoto para AOX) y la significancia estadística se determinó usando el test T-Student. La respuesta a la dieta hiperlipídica se analizó en los tres genotipos (KI AOX, heterocigoto para AOX y genotipo salvaje), se tomaron datos de ganancia de peso (gramos) durante 8 semanas y posteriormente se compararon mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía o factor, seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples.

Por otro lado, el estudio de la posible compensación del fenotipo patológico de los KO por AOX se realizó en cuatro genotipos diferentes. Los ensayos de actividad motora y la actividad de COX fueron las medidas cuantitativas analizadas mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett.

Todos los datos mostrados en los resultados representan medias con sus desviaciones estándar, obtenidos a partir de datos individuales de entre 4 y 15 ratones por grupo. Se realizaron pruebas (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) para verificar el supuesto de normalidad, así como el test de Levene para verificar la homogeneidad de la varianza. El intervalo de confianza se estableció en el 95%, por lo que el valor de significancia necesario para descartar que el efecto era debido al azar fue $p < 0,05$.

4. Resultados

Caracterización funcional del ratón AOX

Con el fin de completar la caracterización funcional de los ratones *knock-in* para AOX y de analizar los efectos asociados a la potencial disminución de la producción de ROS y al potencial desacoplamiento de la cadena respiratoria inducidos por la proteína exógena se realizaron estudios de envejecimiento, de respuesta al estrés térmico y a una dieta hiperlipídica capaz de causar obesidad.

4.1. Seguimiento de longevidad

AOX se ha asociado con la longevidad en las especies donde existe de forma natural y además se ha descrito su capacidad para reducir la producción de ROS [50]. Por ello nos pareció adecuado analizar su posible efecto sobre el envejecimiento en los animales KI. El seguimiento de longevidad de los animales se llevó a cabo con 22 ratones (11 hembras y 11 machos) para determinar si existían diferencias significativas en el envejecimiento entre ratones de genotipo homocigoto para AOX (+/+) y de genotipo salvaje (-/-) separados por sexo. A pesar de que el estudio está inconcluso debido a que algunos animales siguen vivos (13 en total), hasta el momento no se han observado diferencias significativas entre los dos genotipos (Figura 12).

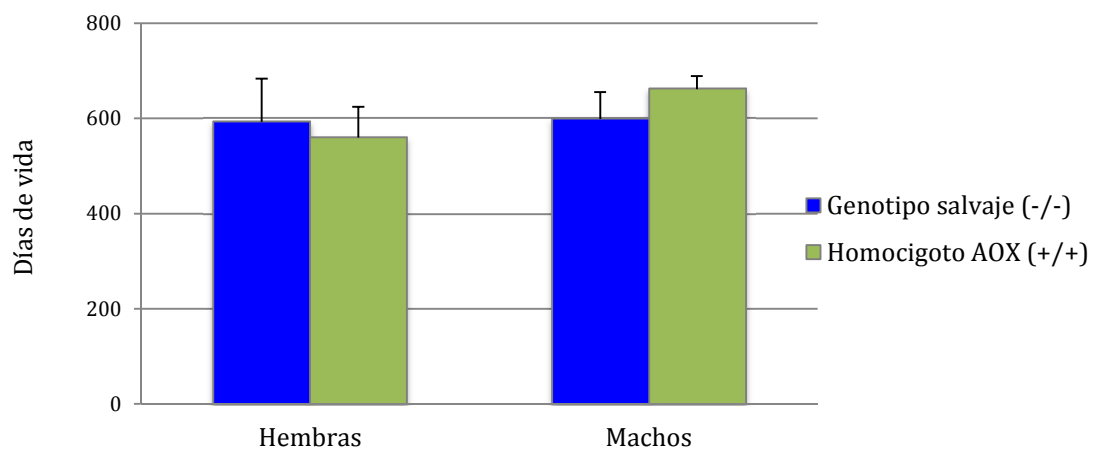


Figura 12. Seguimiento de la longevidad. Días de vida para ratones KI AOX (+/+) y ratones de genotipo salvaje, separados por sexo. Se muestran medias \pm SD (desviación estándar representada por barras verticales). n=22; hembras: 5 AOX (+/+) y 6 genotipo salvaje (-/-); machos: 6 AOX (+/+) y 5 genotipo salvaje (-/-). No hay diferencias significativas.

4.2. Ensayos de respuesta al estrés térmico

La actividad de AOX (transferencia de electrones desde la ubiquinona al oxígeno sin bombeo de protones) equivale en parte a un efecto desacoplante con respecto a la cadena de electrones normal. Por lo tanto, se podrían esperar consecuencias sobre el control de la temperatura (mayor termogénesis en los animales KI) y sobre el gasto energético (mayor para un mismo rendimiento en ATP en los KI) que se pudiera evidenciar en respuesta a una dieta capaz de inducir obesidad. Así, se decidió en primer lugar analizar la actividad y temperatura corporal en respuesta al estrés térmico causado por bajas temperaturas.

Para ello se realizó el ensayo en un total de 16 ratones machos (8 de cada genotipo), a los que se midió la temperatura corporal y la actividad durante el periodo nocturno (19-7h), en tres situaciones diferentes: condición basal de 24°C, condición experimental de 4°C y condición experimental de 4°C con ayuno. El análisis estadístico reveló en el experimento a 4°C (sin ayuno) que la temperatura corporal fue menor para el grupo de ratones de genotipo salvaje (-/-) en comparación con el grupo homocigoto para AOX (+/+) desde las 3 horas, siendo una diferencia significativa desde las 5 a las 6 horas y a las 7 horas 30 minutos tras el inicio del ensayo (Figura 13A). En el resto de experimentos no se observaron diferencias significativas en la temperatura corporal. Por otro lado, en los experimentos de actividad se observó una disminución significativa en condiciones de ayuno a 4°C en los ratones de genotipo salvaje con respecto a los KI AOX (Figura 13B).

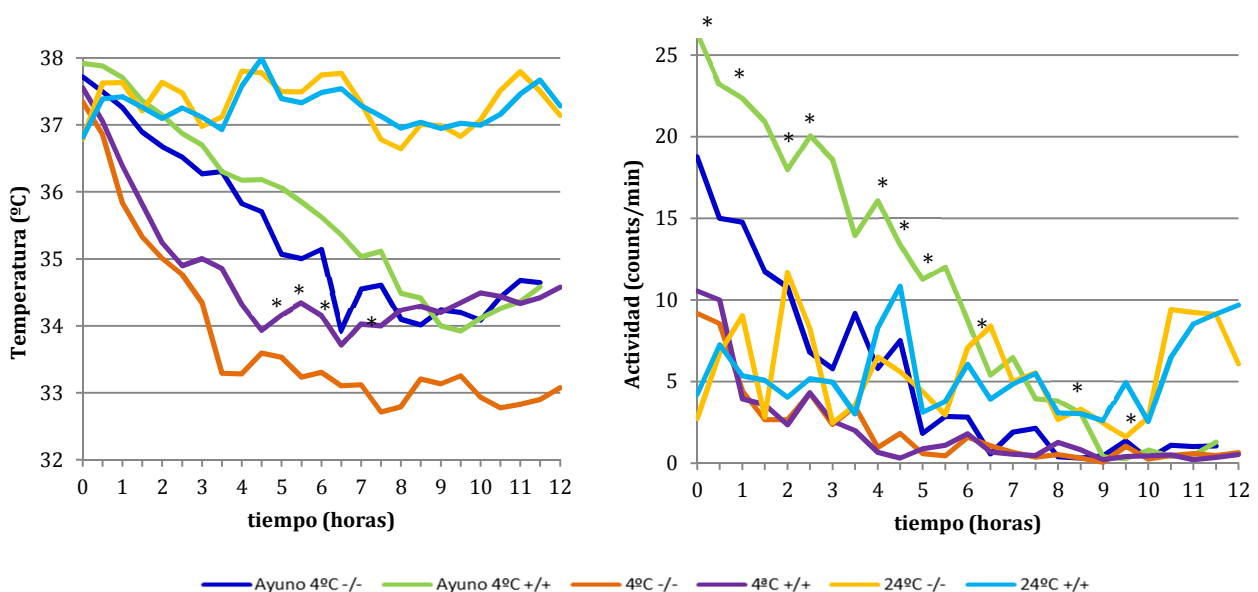


Figura 13. Telemetría. Izquierda: temperatura. **Derecha:** actividad. Medidas obtenidas durante la noche en ratones KI AOX (+/+) y ratones de genotipo salvaje (-/-). Los valores son medias. n=16. Las diferencias significativas ($p<0,05$) se muestran mediante asteriscos (*).

4.3. Ensayos de respuesta a dieta hiperlipídica

Para este ensayo se incluyeron 66 ratones macho adultos (10 semanas de edad) en el primer experimento (Figura 14) y 31 crías macho (4 semanas de edad) en el segundo (Figura 15). Al grupo de adultos se le proporcionó una dieta control (13% lípidos) y una dieta hiperlipídica (60% de las calorías procedentes de lípidos), y al segundo grupo únicamente dieta hiperlipídica. Los pesos de cada animal se siguieron semanalmente. Con el fin de comprobar si las diferencias eran estadísticamente significativas se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Tras una prueba de Dunnett en la que se compararon los grupos con el genotipo salvaje se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso entre el genotipo salvaje y el heterocigoto AOX (+/-) en los ratones adultos alimentados con dieta hiperlipídica ($p < 0,001$). En las crías de 4 semanas no se vieron diferencias significativas ($p > 0,05$).

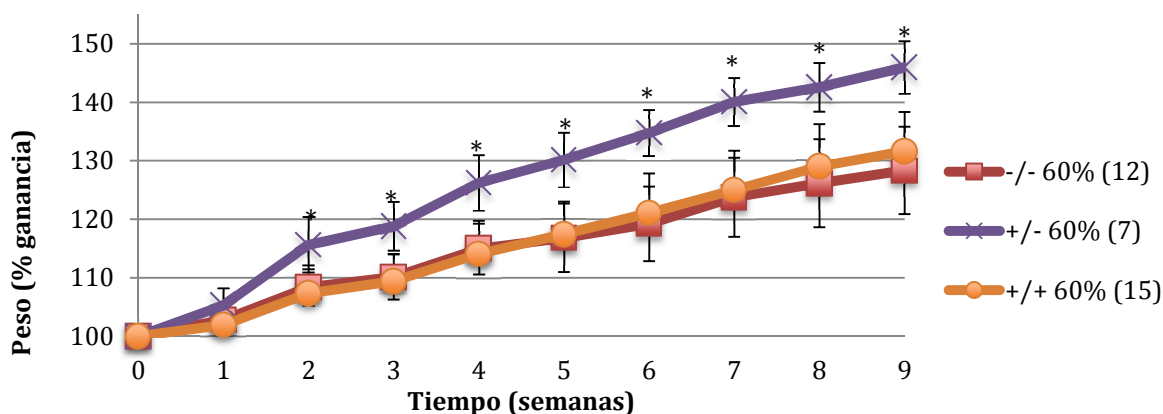


Figura 14. Respuesta de ratones adultos a la dieta hiperlipídica. Porcentaje de ganancia de peso con respecto al inicio del ensayo para los tres genotipos. El tamaño de la muestra (n) se indica entre paréntesis. Se muestran medias \pm SD (barras verticales). En todos los puntos temporales a partir de la segunda semana las diferencias entre el genotipo salvaje y el heterocigoto AOX (+/-) fueron significativas ($p < 0,001$).

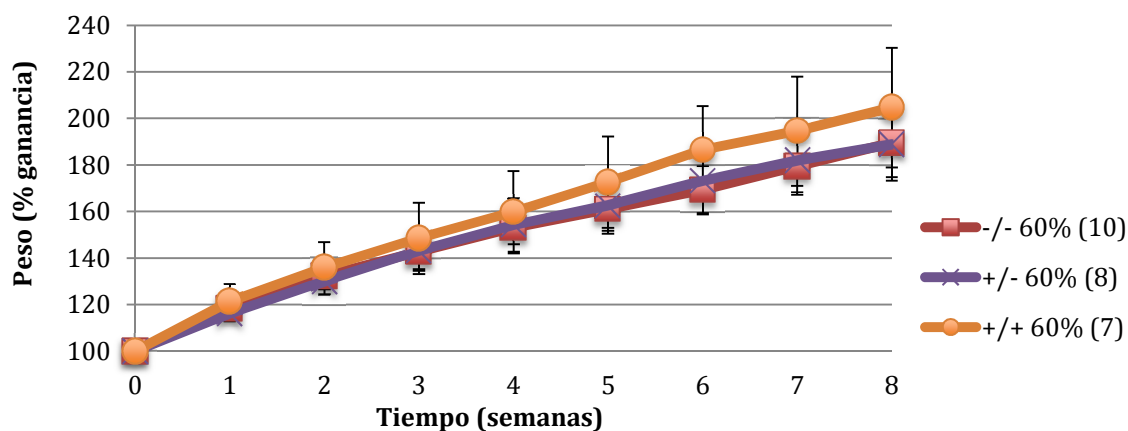


Figura 15. Respuesta de crías de ratón a la dieta hiperlipídica. Porcentaje de ganancia de peso con respecto al inicio del ensayo para los tres genotipos. El tamaño de la muestra (n) se indica en la leyenda entre paréntesis. Se muestran medias \pm SD (barras verticales). No se vieron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Compensación del fenotipo patológico

Con el fin de estudiar la posible compensación por AOX del fenotipo patológico se inició el análisis de los efectos de su expresión en dos modelos *knock-out* para el complejo IV específicos de músculo (COX10 y COX15). Por el número de animales analizados hasta la fecha y dada la variabilidad intrínseca, los resultados solo pueden ser indicativos y preliminares. La miopatía de los modelos KO es progresiva y se manifiesta a partir de los 3-5 meses de edad, por lo que es esencial analizarlos a lo largo del tiempo y compararlos con controles de la misma edad.

4.4. Medidas de actividad motora

Se llevaron a cabo estudios de comportamiento en ratones vivos para comparar su función motora y diferenciar el fenotipo sano del enfermo. Estos ensayos medían la coordinación, fuerza y actividad basal de un total de 45 ratones: 10 de genotipo salvaje, 7 KI AOX, 15 KO y 13 KI-KO, se procesaron para obtener el promedio de las pruebas funcionales y se analizaron las diferencias entre los genotipos (Figura 16). Para ello se realizó un ANOVA y una prueba de Dunnett asumiendo el genotipo salvaje como grupo control. A pesar de que los animales KO tienden a ofrecer resultados más bajos en todos los análisis, únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el genotipo salvaje y los ratones KO en prueba de fuerza de agarre ($p < 0,05$), pero en ningún caso se apreciaron diferencias entre los KO y los KI-KO.

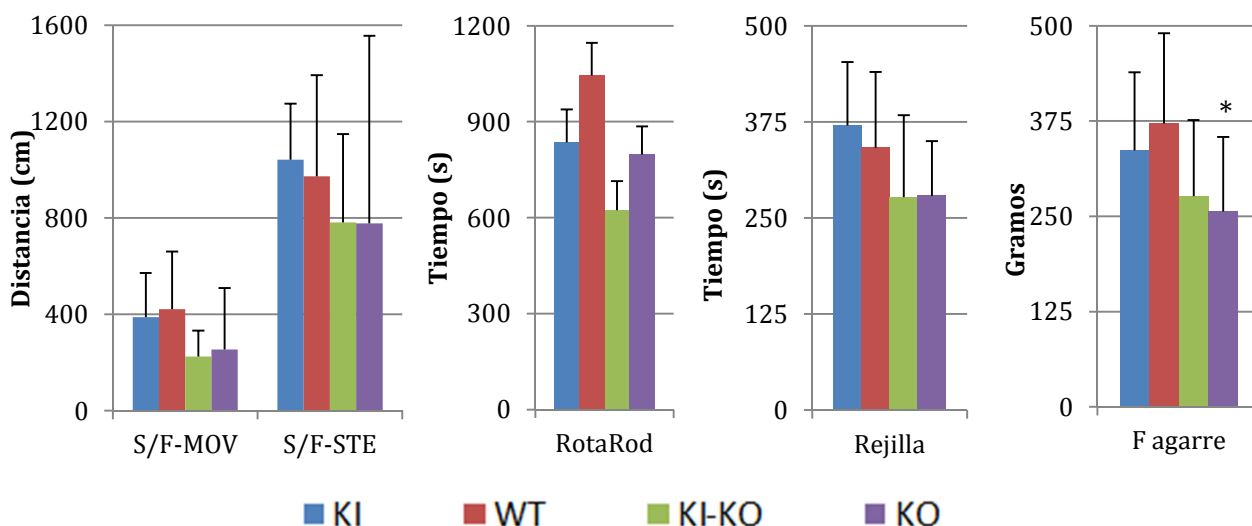


Figura 16. -(De izquierda a derecha)- **Campo abierto:** distancia (cm) recorrida en movimientos rápidos y lentos con desplazamiento (S/F-MOV), y sin desplazamiento (S/F-STE); **Ensayo de coordinación:** tiempo (s) en RotaRod; **Ensayos de fuerza:** tiempo (s) en Rejilla y gramos en Grip-Strength Meter. Genotipo salvaje o WT (n=10), KI (n=7), KI-KO (n=13) y KO (n=15). Medias \pm SD (barras verticales). El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.5. Actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) por espectrofotometría

La actividad del complejo IV (COX) se analizó en corazón y músculo como disminución de la absorbancia a 550 nm debido a la oxidación del citocromo c reducido. Este ensayo se llevó a cabo en un total de 22 ratones: 5 de genotipo salvaje, 4 KI AOX, 5 KO y 8 KI-KO (Figura 17). Mediante ANOVA se analizaron las diferencias entre las medias y se observó que no eran significativas ($p > 0,05$).

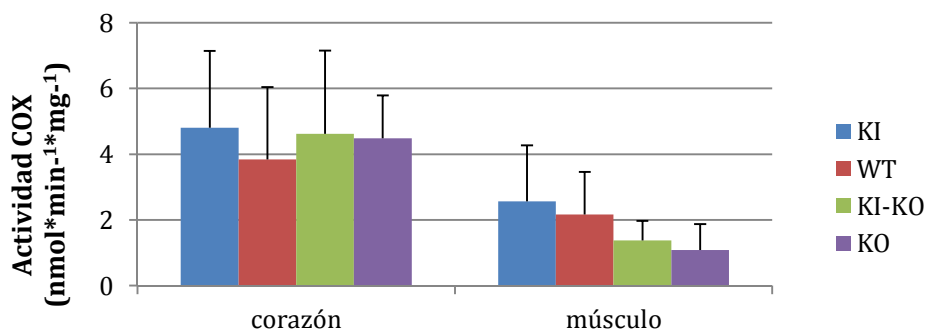


Figura 17. Actividad COX. Se muestran las medidas de actividad del complejo IV en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ obtenidas de corazón y músculo en los ratones de los cuatro genotipos: KI ($n=4$), WT ($n=5$), KI-KO ($n=8$) y KO ($n=5$) Medias \pm SD (barras verticales). Las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

4.6. Expresión de proteína AOX

La detección y localización de la proteína AOX mediante Western-Blot se llevó a cabo en los extractos musculares de los animales a los que se midió la actividad de COX para confirmar la presencia de la proteína. Estas muestras se procesaron para extraer las mitocondrias, en las cuales se localizaría la proteína AOX (42 kDa). Se analizaron los cuatro genotipos y como control positivo se utilizó extracto mitocondrial de fibroblastos recombinantes de ratón C57AOX, que expresan AOX de manera constitutiva (caracterizado y desarrollado previamente por el grupo GENOXPHOS).

Se normalizó por proteína total reutilizando la membrana para analizar los niveles de actina (control de proteína cargada). Un ejemplo representativo de los resultados obtenidos se muestra en la Figura 18.

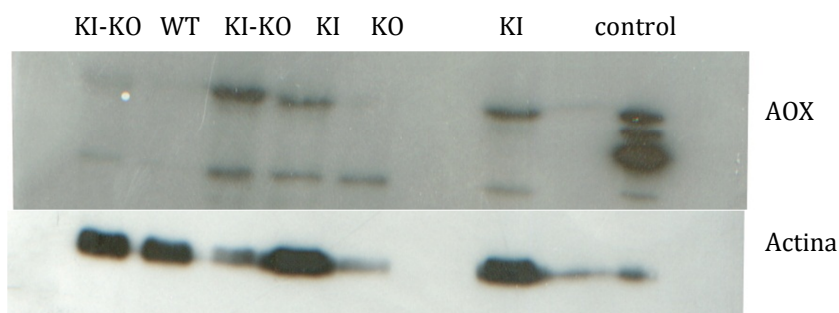


Figura 18. Western-Blot. Se cargaron 300 μg de extracto proteico mitocondrial en cada pocillo y 15 mg de extracto mitocondrial de la línea celular C57AOX como control positivo. Los niveles de expresión de AOX se compararon con los de actina como control de carga.

4.7. Análisis histológicos

Se analizó la morfología de las muestras de músculo para determinar si existían cambios que correlacionaran con su genotipo, en los 22 ratones que además se utilizaron tanto para las medidas de actividad de COX como para la expresión de AOX por Western-Blot.

Todos los ratones de genotipo salvaje tenían una morfología normal, así como los KI AOX a excepción de dos ratones en los que se observaron infiltraciones inflamatorias. Entre los ratones KO había dos sin fenotipo patológico, mientras que los otros dos tenían fibras separadas, uno de ellos con metaplasia grasa entre las fibras por fallos de regeneración muscular. Los KI-KO tenían fenotipos muy variados, siendo tres normales. Los otros cinco presentaban signos de degeneración y regeneración muscular. En la Figura 19 se muestran algunas de las histologías representativas de los resultados.

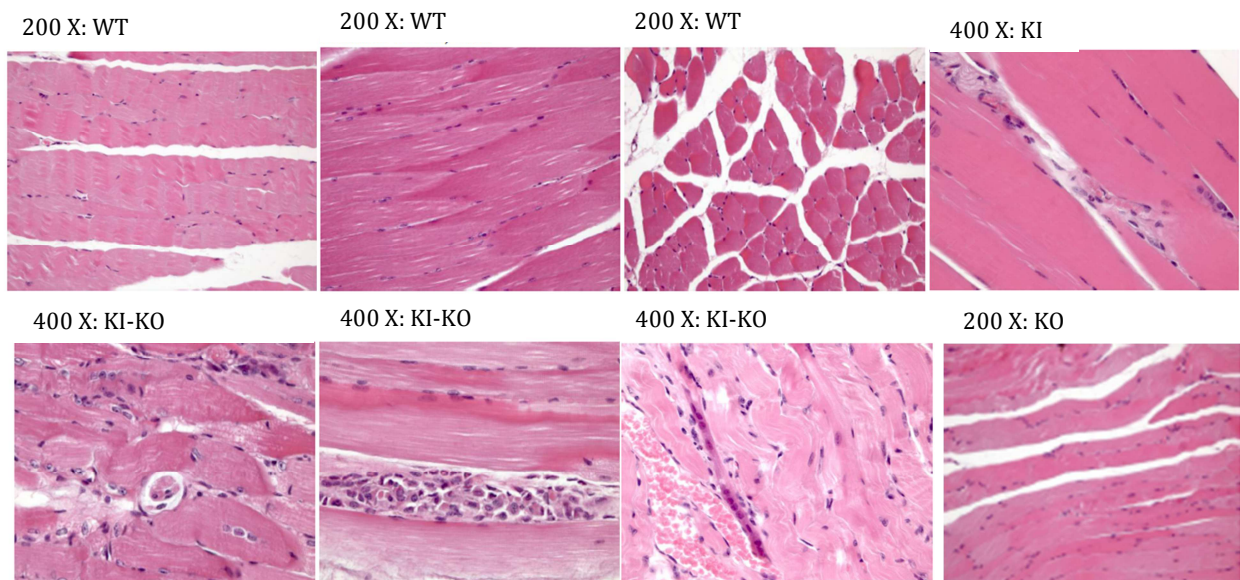


Figura 19. Análisis histológico. Arriba: WT y KI normales. Abajo: KI-KO (De izquierda a derecha): regeneración de fibras y contracciones en zig-zag, degeneración e inflamación, fibras degeneradas en zig-zag. KO con aspecto normal, fibras separadas. Histologías teñidas con el método de Hematoxilina-Eosina (HE) y observados a microscopía óptica a 200 ó 400 aumentos.

5. Discusión

Interpretación de los resultados

La caracterización funcional del ratón KI AOX se llevó a cabo para determinar si la presencia de la proteína tenía algún efecto fisiológico que pudiera observarse en el envejecimiento, la regulación de la temperatura corporal y el desarrollo de obesidad, dadas las actividades de la misma. El seguimiento de longevidad no ha mostrado diferencias en el tiempo de vida de los animales. Mediante telemetría se determinó que tanto en la temperatura como en la actividad en respuesta al estrés térmico los ratones KI para AOX presentan una mayor resistencia al frío en comparación con los de genotipo salvaje. En respuesta a la dieta hiperlipídica el grupo de animales heterocigoto para AOX (+/-) fue más susceptible a la ganancia de peso en el experimento con animales adultos, mientras que en el experimento con animales jóvenes no se observaron diferencias entre los tres genotipos analizados.

En cuanto a la compensación del fenotipo patológico, las pruebas funcionales y la actividad del complejo IV (COX) muestran una ligera tendencia de mejora en los ratones KI-KO con respecto a los KO. La expresión de proteína AOX se detectó en los ratones como confirmación de la presencia de la proteína. Las histologías se realizaron para comprobar el fenotipo patológico de los ratones KO y KI-KO, y analizar el progreso de la degeneración muscular.

Falta de correlación y limitaciones

Los ratones heterocigotos para AOX engordaron más que los de genotipo salvaje y los KI para AOX, efecto no esperado y que por el momento carece de explicación. La resistencia al estrés térmico se esperaba asociada al genotipo KI AOX, y en algunos puntos del experimento se observaron datos que podrían indicarlo así. Ambos resultados deben ser analizados minuciosamente para identificar las causas que podrían estar relacionadas con un posible efecto desacoplante de la proteína AOX en la cadena de transporte de electrones que disminuiría el potencial de membrana. El potencial de membrana es utilizado como fuente de energía para diversos fines, entre ellos producir calor para mantener la temperatura corporal cuando los protones reingresan en la matriz mitocondrial a través de proteínas desacoplaentes. Además, el tamaño de la muestra pudo ser limitante ya que la mayoría de los grupos tenía menos de 15 animales y la estadística puede estar sesgada conduciendo hacia un error de tipo I.

Los resultados de las pruebas funcionales fueron inconcluyentes y también podría deberse al tamaño muestral excesivamente pequeño. Esta limitación no estuvo causada únicamente por la planificación y diseño experimental, sino que la capacidad reproductora de los animales jugó un papel clave, principalmente por la necesidad de realizar cruces para obtener cuatro genotipos diferentes, que además debían ser homocigotos. En las histologías algunos fenotipos no se correlacionaban con los genotipos, esperando verse animales enfermos KI-KO y KO. Además, es posible que el sistema Cre-LoxP, mediante el cual la proteína Cre recombinasa elimina los exones seleccionados para generar los KO, actúe despacio o parcialmente, por lo que los ratones no serían KO y KI-KO completos, y habría aún mayor variabilidad.

En cuanto a la detección de proteína AOX por Western-Blot, a pesar de que la metodología puesta a punto por el grupo GENOXPHOS dio resultados para los fibroblastos recombinantes C57AOX (control positivo) en los que se observaba una triple banda que aparece debido al procesamiento que sufre la proteína al entrar en la mitocondria por parte del sistema de importe mitocondrial (TOM/TIM), fue más difícil de conseguir en extractos mitocondriales de tejidos. Esto puede deberse a que la proteína se degradaba, empezando por la banda que corresponde a un menor peso molecular (la tercera banda), siendo la banda superior, que corresponde a la proteína sin procesar, más intensa. La característica principal de los extractos mitocondriales celulares es que la tercera banda de AOX aparece intensa y corresponde a la proteína madura. Además existe una limitación en la inmunodetección ya que no se disponían de anticuerpos frente a las proteínas Cox10 y Cox15, por lo que no se pudo identificar los animales que las expresaban, es decir, de genotipo salvaje para los genes que las codifican.

Las medidas de actividad de COX deberían realizarse en más animales para poder sacar conclusiones certeras. Posiblemente el método por el que se determina la cantidad de proteína para corregir la actividad, Bradford, no sea el más adecuado en estos volúmenes (la placa de 96 pocillos) ya que suelen formarse agregados que subestimarían las cantidades proteicas.

En trabajos anteriores del grupo GENOXPHOS y los grupos que cedieron los ratones KO de COX se había detectado la expresión de proteínas a nivel de mRNA mediante PCR a tiempo real. Estos experimentos quedan pendientes y posiblemente aclaren los resultados incoherentes.

Cabe destacar que los ratones estudiados en este trabajo se encuentran en un fondo genético mixto (C57 y 129) y se necesitan 10 generaciones de cruces para purificar la especie hacia C57, los cuales se están realizando de forma paralela en el grupo de investigación.

Por último, sería necesario separar los dos tipos de KO (COX10 y COX15) y los grupos resultantes de los cruces entre estos KO con el KI AOX para analizar el comportamiento y posible compensación del fenotipo patológico por separado. Este análisis de datos exhaustivo se podrá realizar cuando haya una muestra mayor, y por tanto más representativa.

Relación con estudios previos

Otros grupos de investigación han conseguido expresar satisfactoriamente una oxidasa alternativa (AOX) del organismo *Ciona intestinalis* en células humanas, demostrando beneficios en el flujo de electrones a través del sistema OXPHOS [46]. Además, observaron que la presencia de AOX tenía efecto beneficioso sobre las consecuencias de defectos en el complejo IV en células de pacientes [51]. Posteriormente, la expresión de AOX en *Drosophila* demostró que se podían compensar parcialmente los efectos de mutaciones patológicas [47]. Recientemente, un estudio en ratones ha demostrado que la expresión de AOX restablece el paso de electrones si se bloquea con inhibidores, y disminuye la producción excesiva de ROS [50].

En investigaciones anteriores realizadas en el grupo GENOXPHOS se demostró que era posible restablecer el transporte de electrones mediante coexpresión de AOX y NDI1 (AOX de *Emericella nidulans* y NADH deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*) en células de mamíferos [48].

El presente proyecto en el que se engloba el trabajo fin de Master investigó la posible compensación del fenotipo patológico de los ratones KO en los genes de las proteínas de ensamblaje del complejo IV. Los ratones fueron cedidos por dos grupos de investigación en los que se estudió el efecto de las mutaciones sobre los animales. Los animales KO COX10 y KO COX15 fueron estudiados para analizar el fenotipo patológico [49, 52, 44] y, a diferencia de los resultados heterogéneos del presente proyecto, los ratones enfermos tenían problemas funcionales graves y las histologías mostraban alteraciones estructurales.

Consecuencias, aplicaciones y sugerencias para estudios posteriores

Los resultados obtenidos en este proyecto apuntan hacia una posible terapia con la oxidasa alternativa de *Emericella nidulans* en mamíferos con defectos en el sistema OXPHOS. Estos resultados junto con otros resultados previos del grupo han demostrado que no existen efectos tóxicos o negativos como consecuencia de dicha expresión en ratones.

Sin embargo, los experimentos realizados para estudiar la funcionalidad y el efecto fenotípico de AOX en los ratones enfermos no han permitido observar la mejora que se esperaba. Esto puede deberse a que el nivel de expresión de AOX en mitocondrias de ratón sea bajo, a una baja eficiencia en el proceso de importe de la proteína a la mitocondria o en su inserción y estabilidad en la membrana interna del orgánulo.

Como continuación del proyecto de investigación del grupo GENOXPHOS, el primer paso será la continuación de los estudios de compensación del fenotipo patológico para aumentar el número de ratones analizados en todos los grupos y obtener resultados que nos permitan establecer conclusiones. Entre los siguientes pasos están el analizar los niveles de mRNA de las proteínas mediante PCR a tiempo real y el estudio del efecto de la expresión de AOX sobre la letalidad embrionaria del modelo KO constitutivo (a diferencia de los presentes músculo específicos). De esta forma se pretende comprobar si AOX es capaz de revertir los defectos funcionales provocados por las mutaciones.

Las alteraciones funcionales provocadas por la mutación, y la posible compensación de la misma con la proteína AOX podría analizarse mediante microscopía electrónica, pudiendo verse así las estructuras celulares con más detalle. Por el momento se han analizado tres ratones por microscopía electrónica para poner a punto la técnica, aunque no se han visto diferencias.

Esta misma aproximación de trabajo descrita para AOX puede llevarse a cabo para NDI1, empleándose como posible herramienta terapéutica frente a enfermedades causadas por deficiencias en el sistema OXPHOS. La xenoexpresión de AOX y NDI1 en pacientes con desordenes mitocondriales podría llegar a tener un importante papel terapéutico en un grupo de enfermedades caracterizado por la ausencia actual de tratamientos.

Otra cuestión pendiente sería la xenoexpresión de una proteína que restablezca el bombeo de protones hacia la matriz. Podría incluso crearse un modelo doble *knock-in* de AOX o NDI1 y una proteína que bombee protones para estudiar su efecto en mutaciones combinadas que comprometen la cadena de transporte electrónico.

Sin embargo, aún hace falta un gran esfuerzo investigador centrado en el desarrollo de modelos, en mejorar y hacer más seguras las técnicas de inserción de DNA en humanos y en estudiar los posibles rechazos inmunológicos debidos a la xenoexpresión.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en la caracterización del ratón AOX nos han llevado a las siguientes conclusiones:

- La proteína AOX expresada en homocigosis (+/+) no influye en el envejecimiento de los ratones al compararlo con el genotipo salvaje (-/-), que no expresa la proteína.
- Los ratones homocigotos para AOX parecen ser más eficientes al mantener la actividad y la temperatura en condiciones de estrés térmico (4°C) y en ayuno que los de genotipo salvaje.
- La xenoexpresión de AOX en heterocigosis (+/-) en ratones adultos sometidos a una dieta hiperlipídica les induce una mayor ganancia de peso que a los de genotipo homocigoto para AOX (+/+) y que a los de genotipo salvaje, que no presentan diferencias observables entre sí.

Los resultados obtenidos de la terapia génica para la compensación por xenoexpresión de AOX del fenotipo patológico de los modelos *knock-out* para el complejo IV específicos de músculo (COX10 y COX15) parecen indicar que:

- La expresión de la proteína AOX no parece suficiente para compensar el fenotipo patológico de déficit motor característico de los ratones KO.
- Los ratones KO que expresan AOX (KI-KO) no restablecen la actividad de COX (complejo IV), aunque presentan una tendencia hacia la mejora.
- AOX presenta un nivel de expresión bajo en los ratones adultos y se degrada al descongelarse empezando por las subunidades de menor tamaño, es decir, las que han sido procesadas tras importarse a la mitocondria.
- Los análisis histológicos de los ratones KI-KO y KO muestran fenotipos muy variados, pudiendo intuirse una mejora en los que expresan AOX.

Bibliografía

1. Cooper GM, Hausman RE. La célula. 5ª Ed. Lugar de publicación: Marban; 2010.
2. Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol.* 1967;14(3):255-74.
3. Nass MM, Nass S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol.* 1963;19:593-611.
4. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290(5806):457-65.
5. Bibb MJ, Van Etten RA, Wright CT, Walberg MW, Clayton DA. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell.* 1981;26(2 Pt 2):167-80.
6. Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.* 2000;408(6813):708-13.
7. Bayona-Bafaluy MP, Acín-Pérez R, Mullikin JC, Park JS, Moreno-Loshuertos R, Hu P, et al. Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(18):5349-55.
8. Kasamatsu H, Vinograd J. Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* 1974;43(0):695-719.
9. Montoya J. Biogénesis y patología mitocondrial. *Rev. Real Academia de Ciencias.* 2005;60:7-28.
10. Enríquez JA, Martínez-Azorín F, Garesse R, López-Pérez MJ, Pérez-Martos A, Bornstein B, Montoya J. Sistema genético mitocondrial humano. *Rev Neurol.* 1998;26(1):S21-6.
11. Clayton DA. Mitochondrial DNA replication: what we know. *IUBMB Life.* 2003;55(4-5):213-7.
12. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6(5):389-402.
13. Barrell BG, Bankier AT, Drouin J. A different genetic code in human mitochondria. *Nature.* 1979;282(5735):189-94.
14. Goffart S, Wiesner RJ. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol.* 2003;88(1):33-40.
15. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol.* 1988;4:289-333.

16. Wallace DC, Fan W. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion*. 2010;10(1):12-31.
17. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet*. 2000;67(3):682-96.
18. Minocherhomji S, Tollefsbol TO, Singh KK. Mitochondrial regulation of epigenetics and its role in human diseases. *Epigenetics*. 2012;7(4):326-34.
19. Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, Sellitto D, Zeviani M, Carrara F, et al. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet*. 1997;60(5):1107-21.
20. Lehtinen SK, Hance N, El Meziane A, Juhola MK, Juhola KM, Karhu R, et al. Genotypic stability, segregation and selection in heteroplasmic human cell lines containing np 3243 mutant mtDNA. *Genetics*. 2000;154(1):363-80.
21. Schatz G. Getting mitochondria to center stage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;434(3):407-10.
22. Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(9):459-66.
23. Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S, et al. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol*. 2003;21(3):281-6.
24. Lill R, Kispal G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(8):352-6.
25. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003;112(4):481-90.
26. Rustin P, Jacobs HT. Respiratory chain alternative enzymes as tools to better understand and counteract respiratory chain deficiencies in human cells and animals. *Physiol Plant*. 2009;137(4):362-70.
27. McDonald AE, Vanlerberghe GC, Staples JF. Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *J Exp Biol*. 2009;212(16):2627-34.
28. Chaudhuri M, Ott RD, Hill GC. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol*. 2006;22(10):484-91.

29. Vanlerberghe GC. Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *Int J Mol Sci.* 2013;14(4):6805-47.
30. Juszczuk IM, Rychter AM. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(4):1257-71.
31. Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr.* 1987;18(5):331-68.
32. Chance B, Williams GR. A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature.* 1955;176(4475):250-4.
33. Acin-Perez R., Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell.* 2008;32(4):529-39.
34. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colás C, Balsa E, Perales-Clemente E, et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science.* 2013;340(6140):1567-70.
35. Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, et al. MITOMAP: a human mitochondrial genome database-2004 update. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D611-3.
36. Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rötig A, Rustin P, Tzagoloff A. Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene.* 2002;286(1):53-63.
37. Massa V, Fernandez-Vizarra E, Alshahwan S, Bakhsh E, Goffrini P, Ferrero I, Mereghetti P, et al. Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase. *Am J Hum Genet.* 2008;82(6):1281-9.
38. Valnot I, von Kleist-Retzow JC, Barrientos A, Gorbatyuk M, Taanman JW, Mehaye B, Rustin P, et al. A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet.* 2000;9(8):1245-9.
39. Antonicka H, Leary SC, Guercin GH, Agar JN, Horvath R, Kennaway NG, Harding CO, et al. Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Hum Mol Genet.* 2003;12(20):2693-702.

40. Coenen MJ, van den Heuvel LP, Ugalde C, Ten Brinke M, Nijtmans LG, Trijbels FJ, Beblo S, et al. Cytochrome c oxidase biogenesis in a patient with a mutation in COX10 gene. *Ann Neurol.* 2004;56(4):560-4.
41. Antonicka H, Mattman A, Carlson CG, Glerum DM, Hoffbuhr KC, Leary SC, Kennaway NG, et al. Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2003;72(1):101-14.
42. Oquendo CE, Antonicka H, Shoubbridge EA, Reardon W, Brown GK. Functional and genetic studies demonstrate that mutation in the COX15 gene can cause Leigh syndrome. *J Med Genet.* 2004;41(7):540-4.
43. Bugiani M, Tiranti V, Farina L, Uziel G, Zeviani M. Novel mutations in COX15 in a long surviving Leigh syndrome patient with cytochrome c oxidase deficiency. *J Med Genet.* 2005;42(5):e28.
44. Viscomi C, Bottani E, Civiletto G, Cerutti R, Moggio M, Fagiolari G, Schon EA, et al. In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1 α axis. *Cell Metab.* 2011;14(1):80-90.
45. Schon EA, DiMauro S, Hirano M, Gilkerson RW. Therapeutic prospects for mitochondrial disease. *Trends Mol Med.* 2010;16(6):268-76.
46. Hakkaart GA, Dassa EP, Jacobs HT, Rustin P. Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. *EMBO Rep.* 2006;7(3):341-5.
47. Fernandez-Ayala DJ, Sanz A, Vartiainen S, Kemppainen KK, Babusiak M, Mustalahti E, Costa R, et al. Expression of the *Ciona intestinalis* alternative oxidase (AOX) in *Drosophila* complements defects in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 2009;9(5):449-60.
48. Perales-Clemente E, Bayona-Bafaluy MP, Pérez-Martos A, Barrientos A, Fernández-Silva P, Enriquez JA. Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(48):18735-9.
49. Diaz F, Thomas CK, Garcia S, Hernandez D, Moraes CT. Mice lacking COX10 in skeletal muscle recapitulate the phenotype of progressive mitochondrial myopathies associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet.* 2005;14(18):2737-48.

50. El-Khoury R, Dufour E, Rak M, Ramanantsoa N, Grandchamp N, Csaba Z, et al. Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome c oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction. *PLoS Genet.* 2013;9(1):e1003182.
51. Dassa EP, Dufour E, Gonçalves S, Paupe V, Hakkaart GA, Jacobs HT, Rustin P. Expression of the alternative oxidase complements cytochrome c oxidase deficiency in human cells. *EMBO Mol Med.* 2009 Apr;1(1):30-6.
52. Diaz F, Garcia S, Hernandez D, Regev A, Rebelo A, Oca-Cossio J, et al. Pathophysiology and fate of hepatocytes in a mouse model of mitochondrial hepatopathies. *Gut.* 2008 Feb;57(2):232-42.